



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

## COMENTARIOS

Con fundamento en el numeral 6.3.3.1 de la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SSA1-2020, se publica el presente proyecto a efecto de que los interesados, a partir del 1º de febrero hasta el 31 de marzo de 2026, lo analicen, evalúen y envíen sus observaciones o comentarios en idioma español y con el sustento técnico suficiente ante la CPFEUM, sita en Río Rhin número 57, colonia Cuauhtémoc, código postal 06500, Ciudad de México, o al correo electrónico: [consultas@farmacopea.org.mx](mailto:consultas@farmacopea.org.mx).

### DATOS DEL PROMOVENTE

Nombre: \_\_\_\_\_  
Institución o empresa: \_\_\_\_\_  
Teléfono: \_\_\_\_\_

Cargo: \_\_\_\_\_  
Dirección: \_\_\_\_\_  
Correo electrónico: \_\_\_\_\_

EL TEXTO EN COLOR ROJO HA SIDO MODIFICADO

Dice	Debe decir	Justificación*
MGA 0100. VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE ANTIBIÓTICOS		
<p><del>La potencia o actividad de los antibióticos se calcula comparando el grado de inhibición de microorganismos sensibles y específicos determinada por concentraciones conocidas del antibiótico analizado y una sustancia de referencia. Las sustancias de referencia empleadas en los ensayos, son sustancias cuya actividad se ha definido por un organismo reconocido por la autoridad sanitaria nacional.</del></p> <p><del>En los antibióticos puede haber ligeros cambios químicos que se traducen en pérdida de actividad antimicrobiana que no pueden demostrarse por métodos químicos, por esta razón, en caso de duda respecto a la actividad de un antibiótico, los métodos de valoración microbiológica prevalecen sobre los métodos químicos.</del></p>		



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Dice	Debe decir	Justificación*																																		
<p>Para valorar microbiológicamente un antibiótico se pueden emplear dos métodos: Método cilindro-placa (método de difusión en agar) y Método turbidimétrico, ambos comparan la respuesta del microorganismo de prueba frente a una Sustancia de referencia (SRef) de actividad conocida y una muestra, tratadas en las mismas condiciones. En la tabla 0100.1 se enlistan los antibióticos que requieren ensayos microbiológicos y se especifica el tipo de ensayo.</p> <p>Tabla 0100.1. Antibióticos que requieren valoración microbiológica.</p>																																				
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Antibiótico</th> <th>Tipo de valoración</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Ampicilina</td><td>Cilindro - placa</td></tr> <tr><td>Amikacina</td><td>Turbidimétrico</td></tr> <tr><td>Amfotericina-B</td><td>Cilindro - placa</td></tr> <tr><td>Bacitracina</td><td>Cilindro - placa</td></tr> <tr><td>Bleomicina</td><td>Cilindro - placa</td></tr> <tr><td>Carbenicilina</td><td>Cilindro - placa</td></tr> <tr><td>Cefalotina</td><td>Cilindro - placa</td></tr> <tr><td>Clortetraciclina</td><td>Turbidimétrica</td></tr> <tr><td>Gloranfenicol</td><td>Turbidimétrico</td></tr> <tr><td>Gloxacilina</td><td>Cilindro - placa</td></tr> <tr><td>Colistina</td><td>Cilindro - placa</td></tr> <tr><td>Demeclócidina</td><td>Turbidimétrico</td></tr> <tr><td>Doxiciclina</td><td>Turbidimétrico</td></tr> <tr><td>Eritromicina</td><td>Cilindro - placa</td></tr> <tr><td>Estreptomicina</td><td>Turbidimétrico</td></tr> <tr><td>Gentamicina</td><td>Cilindro - placa</td></tr> </tbody> </table>	Antibiótico	Tipo de valoración	Ampicilina	Cilindro - placa	Amikacina	Turbidimétrico	Amfotericina-B	Cilindro - placa	Bacitracina	Cilindro - placa	Bleomicina	Cilindro - placa	Carbenicilina	Cilindro - placa	Cefalotina	Cilindro - placa	Clortetraciclina	Turbidimétrica	Gloranfenicol	Turbidimétrico	Gloxacilina	Cilindro - placa	Colistina	Cilindro - placa	Demeclócidina	Turbidimétrico	Doxiciclina	Turbidimétrico	Eritromicina	Cilindro - placa	Estreptomicina	Turbidimétrico	Gentamicina	Cilindro - placa		
Antibiótico	Tipo de valoración																																			
Ampicilina	Cilindro - placa																																			
Amikacina	Turbidimétrico																																			
Amfotericina-B	Cilindro - placa																																			
Bacitracina	Cilindro - placa																																			
Bleomicina	Cilindro - placa																																			
Carbenicilina	Cilindro - placa																																			
Cefalotina	Cilindro - placa																																			
Clortetraciclina	Turbidimétrica																																			
Gloranfenicol	Turbidimétrico																																			
Gloxacilina	Cilindro - placa																																			
Colistina	Cilindro - placa																																			
Demeclócidina	Turbidimétrico																																			
Doxiciclina	Turbidimétrico																																			
Eritromicina	Cilindro - placa																																			
Estreptomicina	Turbidimétrico																																			
Gentamicina	Cilindro - placa																																			



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Dice	Debe decir	Justificación*
Gramicidina	Turbidimétrica	
Kanamicina	Turbidimétrico	
Natamicina	Cilindro-placa	
Netilmicina	Cilindro-placa	
Neomicina	Cilindro-placa	
Nistatina	Cilindro-placa	
Oxitetraciclina	Turbidimétrico	
Paromomicina	Cilindro-placa	
Penicilina G	Cilindro-placa	
Polimixina B	Cilindro-placa	
Rifampicina	Cilindro-placa	
Tetraciclina	Turbidimétrico	
Trobamicina	Turbidimétrico	
Vancomicina	Cilindro-placa	
<b>Método de cilindro en placa (difusión en agar).</b> Se basa en la difusión del antibiótico desde un cilindro vertical, a través de una superficie con agar inyectado con el microorganismo de prueba. La difusión origina zonas de inhibición del microorganismo cuyo tamaño (diámetro) está en relación con la concentración del antibiótico.		
<b>Método turbidimétrico.</b> Se basa en medir espectrofotómetricamente el crecimiento del microorganismo de prueba en un medio de cultivo líquido que permite su rápido crecimiento y en el que al adicionar concentraciones crecientes del antibiótico se inhibe el crecimiento en forma proporcional a la concentración adicionada.		



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Dice	Debe decir	Justificación*
<p><b>Nota:</b> realizar asépticamente todos los procedimientos descritos en el método. Tomar las precauciones de seguridad adecuadas al realizar estas valoraciones debido a las posibles alergias a los fármacos y a que se utilizan cultivos vivos de microorganismos.</p>		
<p><b>Unidades y sustancias de referencia.</b> La potencia de los antibióticos se designa en unidades (U) o en microgramos (<math>\mu\text{g}</math>) de actividad. En un principio, se consideraba que un antibiótico seleccionado como sustancia de referencia constaba en su totalidad de una sola entidad química y por lo tanto, se le asignaba una potencia de 1 000 <math>\mu\text{g}/\text{mg}</math>. En muchos de estos casos, a medida que los métodos de fabricación y purificación para ciertos antibióticos avanzaron en su desarrollo, fue posible obtener antibióticos con más de 1 000 <math>\mu\text{g}</math> de actividad/mg. Los antibióticos mencionados tenían una actividad equivalente a un número determinado de microgramos de la sustancia de referencia original. No obstante, la mayoría de las veces, los microgramos de actividad son numérica y exactamente equivalentes a los microgramos (masa) de la sustancia pura. En ciertas ocasiones, como las citadas a continuación los microgramos de actividad definidos en términos de la sustancia de referencia equivalen a una unidad:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cuando el antibiótico se presenta como la base libre y en forma de sal, y los microgramos de actividad han sido</li> </ul>		



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Dice	Debe decir	Justificación*
definidos en términos de una de estas formas.		
<ul style="list-style-type: none"><li>• <del>Cuando el antibiótico consta de un número de componentes que son químicamente similares pero que difieren en actividad antibiótica.</del></li><li>• <del>Cuando las potencias de una familia de antibióticos se expresan en términos de una sustancia de referencia que consta de un solo miembro de la familia el cual por sí mismo puede ser heterogéneo. No se debe asumir que los microgramos de actividad corresponden a los microgramos (masa) del antibiótico.</del></li></ul>		
<del>Control de temperatura. Se requiere control termostático en varias etapas de una valoración microbiológica: durante el cultivo de un microorganismo y la preparación de su inóculo, así como durante la incubación en las valoraciones en placa o tubo.</del>		
<del>Microorganismo de prueba. El microorganismo de prueba para cada antibiótico se enlista en la tabla 0100.4 para la valoración de cilindro-placa y en la tabla 0100.11 para la valoración turbidimétrica. Los microorganismos de prueba se especifican mediante un número de identificación de la American Type Culture Collection (ATCC). Para asegurar el desempeño aceptable de los microorganismos de prueba, estos deben almacenarse y conservarse de manera apropiada. Durante la validación o verificación del método se</del>		



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>deben establecer las condiciones de almacenamiento específicas. Si se observa un cambio en las características morfológicas y fisiológicas del microorganismo, desechar los cultivos.</p>		
<p><b>Almacenamiento prolongado.</b> Para el almacenamiento prolongado, mantener los microorganismos de prueba en una solución de almacenamiento adecuada, tal como suero fetal de ternero al 50 %, en caldo glicerol del 10 al 15 %, en caldo soya tripticaseína, sangre de oveja desfribinada o en leche descremada. Los cultivos que se almacenan durante períodos prolongados se recomienda liofilizarlos; se prefieren temperaturas de -60 °C o inferiores; son aceptables temperaturas inferiores a -20 °C.</p>		
<p><b>Cultivos primarios.</b> Preparar los cultivos primarios transfiriendo microorganismos de prueba de los viales de almacenamiento prolongado a medios apropiados e incubar en condiciones adecuadas. Almacenar los cultivos primarios a la temperatura apropiada, por lo general de 2 a 8 °C, y desechar después de tres semanas. Se puede usar el mismo cultivo primario para preparar los cultivos de trabajo por un máximo de siete días únicamente.</p>		
<p><b>Cultivos de trabajo.</b> Preparar los cultivos de trabajo transfiriendo el cultivo primario a medios sólidos apropiados para obtener colonias aisladas. Incubar los cultivos de trabajo en condiciones apropiadas para obtener un crecimiento satisfactorio para la preparación de los inóculos de prueba.</p>		



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Dice	Debe decir	Justificación*
<p><b>Crecimiento o desempeño no característico de un microorganismo de prueba.</b> Usar cultivos madre, cultivos primarios o cultivos de trabajo nuevos cuando un microorganismo de prueba presente crecimiento o desempeño no característico.</p>		
<p><b>MEDIOS DE CULTIVO</b> Preparar los medios de cultivo a partir de mezclas deshidratadas comerciales siguiendo las indicaciones del fabricante. Cuando sea necesario prepararlos a partir de ingredientes, se permiten pequeñas modificaciones siempre y cuando los medios de cultivo presenten propiedades promotoras de crecimiento iguales o mejores a los medios aquí descritos (véase tabla 0100.3). Disolver en 1.0 L de agua purificada los ingredientes especificados, determinar el pH, si es necesario, ajustar con soluciones de hidróxido de sodio 1.0 N o ácido clorhídrico 1.0 N, según se requiera para que después de esterilizar se obtenga el pH señalado en la tabla 0100.3. A menos que se indique lo contrario esterilizar en autoclave usando ciclos de esterilización validados.</p>		
<p><b>Material y equipo.</b> El material que se usa debe estar limpio y seco, libre de residuos de detergente y antibiótico. En el caso de los cilindros ocasionalmente se requiere una limpieza con un baño de ácido por ejemplo ácido nítrico 2 N o con ácido crómico (véase <i>Limpieza de material de vidrio</i> en el capítulo de Generalidades). El material en contacto con el microorganismo de prueba debe esterilizarse empleando procesos validados.</p>		



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Dice	Debe decir	Justificación*
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cajas de Petri de vidrio o plástico de 20 x 100 mm.</li> </ul>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cilindros de acero inoxidable o porcelana con las siguientes dimensiones: Diámetro externo <math>8 \pm 0.1</math> mm Diámetro interno <math>6 \pm 0.1</math> mm Longitud de <math>10 \pm 0.1</math> mm</li> </ul>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tapas de porcelana poresa.</li> </ul>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Material volumétrico de diferente capacidad</li> </ul>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tubos de ensayo estériles de <math>16 \times 125</math> mm o de <math>18 \times 150</math> mm, con un espesor relativamente uniforme, sin defectos ni ralladuras en la superficie. Los tubos que se usen en el espectrofotómetro deben ser iguales, sin ralladuras ni defectos.</li> </ul>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tapas metálicas o de plástico resistentes a la esterilización.</li> </ul>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incubadora con termostato capaz de mantener la temperatura con variación no mayor de <math>\pm 0.5</math> °C de la temperatura seleccionada.</li> </ul>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baño de agua o aire caliente con termostato capaz de mantener la temperatura seleccionada con una variación no mayor de <math>\pm 0.1</math> °C.</li> </ul>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Espectrofotómetro a una longitud de onda a 530 o 580 nm.</li> </ul>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Medidor de zonas de inhibición (comparador óptico o vernier) calibrado.</li> </ul>		



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Dice	Debe decir	Justificación*																																								
<b>Soluciones amortiguadoras de fosfato y otras soluciones</b> <del>Preparar las soluciones amortiguadoras con agua purificada como se indica en la tabla 0100.2, determinar el pH de la solución, si es necesario ajustar con soluciones de ácido fosfórico 18 N o hidróxido de potasio 10 N, según se requiera, para que después de la esterilización se obtenga el pH indicado en cada caso. A menos que se indique lo contrario esterilizar en autoclave usando procesos de esterilización validados.</del>																																										
<b>Otras soluciones</b> <del>Para preparar estas soluciones consultar los capítulos de reactivos y soluciones reactivo (SR) y de soluciones volumétricas (SV). Usar agua purificada. Como solución salina use solución salina inyectable. La solución de formaldehído se prepara diluyendo con agua en una proporción 1:3.</del>																																										
<b>Métodos de secado de la sustancia de referencia.</b> Para cada sustancia de referencia consultar en la etiqueta las indicaciones de secado. <del>Tabla 0100.2. Soluciones amortiguadoras.</del>																																										
<b>Ingredientes</b> <b>Número</b> <del>gramos por litro de agua</del> <table border="1"> <thead> <tr> <th>1</th><th>3</th><th>4</th><th>6</th><th>10</th><th>16</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Concentración</td><td>1 %</td><td>0.1 M</td><td>0.1 M</td><td>10 %</td><td>0.2 M</td><td>0.1 M</td></tr> <tr> <td>pH</td><td><math>6.0 \pm 0.05</math></td><td><math>8.0 \pm 0.1</math></td><td><math>4.5 \pm 0.05</math></td><td><math>6.0 \pm 0.05</math></td><td><math>10.5 \pm 0.1</math></td><td><math>7.0 \pm 0.2</math></td></tr> <tr> <td><math>K_2HPO_4</math></td><td>2.0</td><td>16.73</td><td>-</td><td>20.0</td><td>35.0</td><td>13.6</td></tr> <tr> <td><math>KH_2PO_4</math></td><td>8.0</td><td>0.523</td><td>13.61</td><td>80.0</td><td>-</td><td>4.0</td></tr> <tr> <td>KOH 10 N</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>2.0 (mL)</td><td>-</td></tr> </tbody> </table>	1	3	4	6	10	16	Concentración	1 %	0.1 M	0.1 M	10 %	0.2 M	0.1 M	pH	$6.0 \pm 0.05$	$8.0 \pm 0.1$	$4.5 \pm 0.05$	$6.0 \pm 0.05$	$10.5 \pm 0.1$	$7.0 \pm 0.2$	$K_2HPO_4$	2.0	16.73	-	20.0	35.0	13.6	$KH_2PO_4$	8.0	0.523	13.61	80.0	-	4.0	KOH 10 N	-	-	-	-	2.0 (mL)	-	
1	3	4	6	10	16																																					
Concentración	1 %	0.1 M	0.1 M	10 %	0.2 M	0.1 M																																				
pH	$6.0 \pm 0.05$	$8.0 \pm 0.1$	$4.5 \pm 0.05$	$6.0 \pm 0.05$	$10.5 \pm 0.1$	$7.0 \pm 0.2$																																				
$K_2HPO_4$	2.0	16.73	-	20.0	35.0	13.6																																				
$KH_2PO_4$	8.0	0.523	13.61	80.0	-	4.0																																				
KOH 10 N	-	-	-	-	2.0 (mL)	-																																				



"2026, Año de Margarita Maza Parada"

Dice				Debe decir								Justificación*									
Ingredientes	Número	gramos por litro		4	2	3	4	5	8	9	10	11	13	19*	32	34	35	36	39	40	41
Peptona <sup>(1)</sup>		6.0	6.0	5.0	6.0	6.0	6.0	-	-	6.0	10.0	9.4	6.0	10.0	10.0	15.0	5.0	-	-	-	
Peptona de caseína	4.0	-	-	-	-	-	-	17.0	17.0	4.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9.0	
Peptona de soya	-	-	-	-	-	-	-	3.0	3.0	-	-	-	-	-	-	5.0	-	-	-	-	
Polipeptona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.0	-	-	
Extracto de levadura	3.0	3.0	1.5	3.0	3.0	3.0	-	-	3.0	-	4.7	3.0	-	-	-	-	1.5	20.0	5.0	-	
Extracto de carne	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	-	-	1.5	-	2.4	1.5	10.0	10.0	-	1.5	-	-	-	-	
Dextrosa	1.0	-	1.0	1.0	-	-	2.5	2.5	1.0	20.0	10.0	1.0	-	-	-	1.0	10.0	20.0	-	-	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	3.68	-	-	-	2.5	2.5	-	-	-	-	-	-	-	-	3.68	-	1.0	-	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	1.32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.32	2.0	1.0	-	
Cloruro de sodio	-	-	3.5	-	-	-	5.0	5.0	-	-	10.0	-	3.0	3.0	5.0	3.5	-	-	-	-	-
Polisorbato 80 <sup>(2)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	10.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-	
Glicerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10.0	10.0	-	-	-	-	-	-	
Agar	15.0	15.0	-	15.0	15.0	15.0	20.0	12.0	15.0	-	23.5	15.0	-	17.0	15.0	-	10.0	-	-	-	
Sulfato de manganeso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	
Citrato de sodio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10.0	
pH después de esterilizar	6.6±0. 4	6.6±0. 4	7.0±0.0 5	6.6±0.1 4	7.9±0. 4	5.9±0. 4	7.2±0. 4	7.2±0. 4	8.3±0. 4	5.6±0.1 4	6.1±0. 4	6.6±0. 4	7.0±0. 4	7.0±0. 4	7.3±0. 4	7.9±0.1 4	6.7±0.2 4	6.8±0. 4	-	-	

<sup>(1)</sup> Utilizar peptona de carne o caseína.

<sup>(2)</sup> Agregar después de hervir el medio de cultivo.

\* Equivalente al medio de cultivo Antibiótico núm. 12.



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Dice	Debe decir	Justificación*
<p><b>DISEÑO DE VALORACIÓN</b> <del>Los diseños experimentales adecuados son clave para aumentar la precisión y minimizar el sesgo. Controlar los parámetros de incubación (es crítica la homogeneidad de la temperatura dentro de la cámara de incubación y el tiempo de incubación), esto se puede lograr acomodando las placas y las gradillas según se indica en el patrón de calificación del equipo y respetando el intervalo de temperatura para cada valoración, para minimizar el sesgo.</del></p>		
<p><b>VALORACIÓN CILINDRO-PLACA (MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR)</b> <del>Las comparaciones se limitan a las relaciones entre las condiciones del diámetro de la zona de inhibición dentro de las placas, sin tener en cuenta la variación entre placas. Las respuestas individuales de las placas se corregirán basándose en el tamaño relativo de la zona de inhibición de la SRef (c) comparado con el tamaño medio de la zona de inhibición de la SRef (c<sub>36</sub>) en todas las placas (a,b,d,e).</del></p>		
<p><b>VALORACIÓN TURBIDIMÉTRICA</b> <del>Para evitar un sesgo sistemático, colocar aleatoriamente en gradillas por separado tubos por duplicado, de manera que cada gradilla contenga un conjunto completo de tratamientos. El propósito de esta configuración es minimizar la influencia de la distribución de la temperatura sobre las muestras. Así mismo la influencia de la variación de temperatura se puede disminuir asegurando un flujo de aire o la convección de calor apropiado</del></p>		



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>durante la incubación (baño de agitación). Colocar en cada gradilla por lo menos tres tubos para cada concentración de la muestra y la SRef. Las comparaciones se limitan a las relaciones entre los valores de turbidez observados dentro de las gradillas.</p> <p><b>CONSIDERACIONES SOBRE VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA</b></p> <p>Considerando las restricciones citadas anteriormente el diseño de la valoración recomendado emplea una curva tipo de la SRef de cinco concentraciones y una sola concentración para cada muestra. Para valoraciones cilindro-placa; cada placa incluye únicamente dos tratamientos; el tratamiento de referencia (la concentración central de los niveles de la SRef es decir "c" y una de las otras cuatro concentraciones de la SRef "a, b, d, e" o la muestra "m"). La concentración de la muestra es una estimación basada en la concentración deseada. La muestra se debe diluir para proporcionar una concentración nominal que se estima es equivalente a la concentración de la SRef "c". El propósito de diluir la muestra a la concentración central de la SRef es asegurar que el resultado de ella caerá dentro de la porción lineal de la curva tipo. La prueba determina la potencia relativa de la muestra ("m") en función de la curva tipo. La muestra "m" debe tener una potencia relativa de aproximadamente 100 %. La potencia final de la muestra se obtiene multiplicando el resultado de la muestra por el factor de dilución. Una valoración debe</p>		



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>considerarse preliminar si el valor de potencia de la muestra calculado es inferior al 80 % o superior a 125 %. En dicho caso los resultados sugieren que la concentración de la muestra supuesta durante la preparación de la solución madre de la muestra es incorrecta; ya que la potencia se derivará de una porción de la curva tipo donde la respuesta de la SRef y de la muestra probablemente no es paralela. Si esto ocurre se puede ajustar la potencia supuesta de la muestra basándose en el valor de potencia preliminar y repetir la valoración.</p> <p>Las determinaciones microbiológicas de potencia están sujetas a variables intervaloración e intravaloración, de modo tal que se requieren dos o más valoraciones independientes para obtener una estimación confiable de la potencia de una muestra determinada. Partiendo de soluciones madre y diluciones de prueba tanto de la SRef como de la muestra, preparadas por separado, llevar a cabo otro día valoraciones adicionales de una muestra determinada. La potencia media debe incluir los resultados de todas las valoraciones independientes válidas. El número de valoraciones requerido para lograr una estimación de potencia confiable depende de la variabilidad de la valoración y de la incertidumbre máxima requerida para la estimación de potencia. Esta última se evalúa mediante la amplitud del intervalo de confianza. El resultado combinado de una serie de valoraciones independientes más pequeñas a lo largo de varios días es una estimación de potencia más confiable que la obtenida de una sola</p>		



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>valoración grande con el mismo número total de placas o tubos. Se debe tomar en cuenta que las valoraciones adicionales o una menor variabilidad permiten que el producto cumpla con intervalos de especificación más estrechos. Al reducir la variabilidad de las valoraciones se logra el límite de confianza requerido con menos valoraciones.</p> <p><b>VALORACIÓN CILINDRO – PLACA</b></p> <p><b>Control de temperatura.</b> Usar equipo calificado y calibrado de manera apropiada para obtener los márgenes de temperatura especificados en la tabla 0.100.4.</p> <p><b>Aparato.</b> Medidor de zonas de inhibición (comparador óptico o vernier) calibrado.</p> <p><b>Cajas.</b> Cajas Petri de vidrio o plástico desechables (de 20 x 100 mm).</p> <p><b>Tapas de porcelana porosa.</b></p> <p><b>Cilindros.</b> Cilindros de acero inoxidable o porcelana, de <math>8 \pm 0.1</math> mm de diámetro externo; de <math>6 \pm 0.1</math> mm de diámetro interno, de <math>10 \pm 0.1</math> mm de altura.</p> <p><b>Preparación de las diluciones de la SRef.</b> Para cada SRef consultar las condiciones de secado en su etiqueta. En la tabla 0100.5 se indica el disolvente inicial, la concentración madre de la SRef, duración en refrigeración, diluyente final y la concentración central (c). Considerando la concentración central (c) indicada en la tabla 0100.5 y el factor de dilución 1:1.25 preparar las cinco concentraciones de la curva tipo, dos por debajo (a, b) y dos por arriba (d, e) de la concentración central (c). Conservar la solución</p>		



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>concentrada en refrigeración y usar dentro del periodo de almacenamiento indicado en la tabla 0100.5.</p> <p><b>Preparación de la muestra.</b> Para preparar la solución de prueba de la muestra, proceder de acuerdo a lo indicado en la monografía específica del producto. El día de la valoración preparar una solución madre de la misma manera que se especifica para la concentración central ("c") de la SRef. (véase la tabla 0100.5)</p> <p><b>Preparación del inóculo.</b> A partir de un cultivo reciente del microorganismo de prueba apropiado (tabla 0100.4) preparar una suspensión en 3 mL de solución salina estéril, para facilitar la suspensión se pueden usar perlas de vidrio. Espesar la suspensión así obtenida sobre la superficie de dos o más placas de agar o sobre la superficie de un frasco Roux que contenga 250 mL del medio especificado en la tabla 0100.4.</p> <p>Incubar durante el tiempo y la temperatura especificados en la tabla 0100.4, o hasta que el crecimiento sea evidente. Despues de incubar, recolectar los microorganismos de las placas o frasco Roux con aproximadamente 50 mL de solución salina estéril (excepto en el caso de Bleomicina para el que debe usarse Medio 34; véase la tabla 0100.4), usando una varilla de vidrio estéril dobrada en ángulo o perlas de vidrio estériles. Transferir la suspensión a un frasco de vidrio estéril. Esta es la suspensión de recolección o suspensión madre.</p> <p>Para ajustar la suspensión, diluir una pequeña</p>		



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>alícuota usando el factor de dilución sugerido en la tabla 0100.4, leer el porcentaje de transmitancia de la dilución a una longitud de onda de 580 nm, la dilución de la suspensión original debe proporcionar una lectura de <math>25 \pm 2\%</math> de transmitancia. Esta dilución, sólo sirve de referencia para ajustar la transmitancia de la suspensión original, ésta es la que se inocula a la capa siembra.</p> <p>Tomando como base el por ciento de inóculo sugerido en la tabla 0100.4, determinar el volumen de suspensión que debe adicionarse a cada 100 mL de la capa siembra para obtener zonas de inhibición bien definidas y de tamaño adecuado (14 a 16 mm de diámetro para la concentración central de la SRef "c"). Conservar la suspensión en refrigeración durante el periodo sugerido en la tabla 0.100.4.</p> <p><b>Nota:</b> los tamaños de las zonas de inhibición fuera del intervalo de 11 a 19 mm no son adecuados, debido a que contribuyen a la variabilidad de la valoración.</p> <p><b>Análisis.</b> Para cada ensayo debe realizarse la curva tipo de la sustancia de referencia. Preparar el volumen necesario del medio de cultivo para la capa base. Depositar en cada caja el volumen de capa base indicando en la tabla 0100.6. Dejar solidificar. Preparar la cantidad apropiada de inóculo para la capa siembra según se indica para el antibiótico correspondiente. Depositar en cada caja el volumen de capa siembra indicada en la tabla 0100.7. Inclinar la caja hacia atrás y hacia</p>		



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Dice	Debe decir	Justificación*
<p><del>adelante para espacer el inóculo uniformemente sobre la superficie de la capa base y dejar solidificar.</del></p> <p><del>Colocar seis cilindros de acero inoxidable sobre la superficie inoculada (capa siembra), utilizando una guía mecánica u otro dispositivo para asegurar el espacio uniforme en un radio de 2.8 cm.</del></p> <p><del>Para la curva dosis respuesta utilizar un total de 12 placas, tres para cada concentración, excepto para la concentración central o punto de referencia de la curva ("c"), la cual se incluye en todas las placas. Llenar tres cilindros de un conjunto de tres placas con la concentración de referencia y alternar tres cilindros con la concentración más baja y así sucesivamente para cada concentración. De esta manera se obtienen 36 zonas de inhibición para la concentración de referencia ("c") y nueve para las cuatro concentraciones restantes de la curva ("a, b, d y e").</del></p> <p><del>Para cada muestra utilizar tres placas, llenar tres cilindros de cada placa con la concentración central de referencia ("c") y en forma alterna llenar los otros tres con la muestra preparada a la concentración central o de referencia. Incubar las placas durante 16 a 18 h a la temperatura indicada para cada antibiótico en la tabla 0100.4. Concluido el periodo de incubación medir el diámetro de las zonas de inhibición.</del></p> <p><i>Tabla 0100.4. Microorganismo de prueba para valoración cilindro—placa (Preparación del inóculo).</i></p>		



"2026, Año de Margarita Maza Parada"

Antibiótico	Microorganismo de prueba	Número ATCC <sup>a</sup>	Debe decir			Justificación*	
			Condiciones de incubación	Factor de dilución	Volumen de inóculo sugerido mL/100 mL		
			Medio de cultivo	Temp. (°C)	Tiempo		
Ampicilina	<i>Micrococcus luteus</i>	9341	4	32–35	24 h	1:40 0.5	2 semanas
Amfotericina B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9763	19	29–31	48 h	1:30 1.0	4 semanas
Bacitracina	<i>Kocuria rhizophila</i> *	9341	4	32–35	24 h	1:35 0.3	2 semanas
Bleomicina	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	607	36	36–37.5	48 h	- 1.0	2 semanas
Carbenicilina	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25619	4	36–37.5	24 h	1:25 0.5	2 semanas
Cefalotina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	4	32–35	24 h	1:25 0.1	Determinar
Cloxacilina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	4	32–35	24 h	1:20 0.1	1 semana
Colistina	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617	4	32–35	24 h	1:20 0.1	2 semanas
Eritromicina	<i>Micrococcus luteus</i>	9341	4	32–35	24 h	1:40 1.5	2 semanas
Gentamicina	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	4	32–35	24 h	1:24 0.03	1 semana
Neomicina	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	4	32–35	24 h	1:24 0.4	1 semana
Netilmicina	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	2	33–35	25 h	1:24 0.25	1 semana
Nistatina	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2601	19	29–31	48 h	1:35 1.0	4 semanas



"2026, Año de Margarita Maza Parada"

Dice		Debe decir					Justificación*
Paromomicina	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	1	32–35	24 h	1:24	2.0
Penicilina G	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	1	32–35	24 h	1:20	1.0
Polimixina B	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617	1	32–35	24 h	1:20	0.1
Rifampicina	<i>Bacillus subtilis</i>	6633	32	32–35	5 días	-	Determinar
Vancomicina	<i>Bacillus subtilis</i>	6633	32	32–35	5 días	-	Determinar
<sup>a</sup> American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas VA 20110-2209 ( <a href="http://www.atcc.org">http://www.atcc.org</a> )							
*Anteriormente: <i>Micrococcus luteus</i>							
Tabla 0100.5. Preparación de la solución madre y diluciones de prueba de la SRef (método cilindro-placa).							

Antibiótico	Solución madre	Dilución de prueba			Cone. media (unidades o µg/mL) (e)
	Disolvente inicial, (y concentración inicial donde se especifique) diluyente posterior si es diferente	Cone. final de la solución madre (mL)	Duración en refrigeración	Diluyente final	
Ampicilina <sup>(1)</sup>	Agua	0.1 mg	7 días		
Amfotericina B <sup>(1)(2)</sup>	Dimetil sulfóxido	1 mg	Mismo día	B. 10	1.0 µg
Bacitracina de zinc <sup>(3)</sup>	Ácido clorhídrico 0.01 N	100 U	Mismo día	B. 1	1.0 U
Bleomicina	B. 16	2 U	14 días	B. 16	0.04 U
Carbenicilina	B. 1	1 mg	14 días	B. 1	20 µg
Cefalotina	B. 1	1 mg	5 días	B. 1	1.0 µg
Cloxacilina	B. 1	1 mg	7 días	B. 1	5.0 µg
Colistina	Agua (10 mg/mL); [B. 6]	1 mg	14 días	B. 6	1.0 µg
Eritromicina	Metanol (10 mg/mL); [B. 3]	1 mg	14 días	B. 3	1.0 µg



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Dice		Debe decir		Justificación*
Gentamicina	B.-3	1 mg	30 días	B.-3
Natamicina	Dimetil sulfóxido	1 mg	Mismo día	B.-10
Neomicina <sup>(4)</sup>	B.-3	1 mg	14 días	B.-3
Netilmicina	B.-3	1 mg	7 días	B.-3
Nistatina <sup>(1)(5)</sup>	Dimetilformamida	1 000 U	Mismo día	B.-6
Paromomicina	B.-3	1 mg	21 días	B.-3
Penicilina G	B.-1	1 000 U	4 días	B.-1
Poliximina B <sup>(6)</sup>	Agua; [B.-6]	10 000 U	14 días	B.-6
Rifampicina	Metanol	1 mg	1 día	B.-1
Vancomicina	Agua	1 mg	7 días	B.-4
<p><b>Notas:</b> "B" denota "solución amortiguadora" y el número que sigue se refiere a las soluciones amortiguadoras de fosfato de potasio definidas en este capítulo.</p> <p>(1) Para amfotericina B, colismetato sódico y nistatina, preparar las diluciones de la sustancia de referencia y de la muestra simultáneamente.</p> <p>(2) Para amfotericina B, diluir nuevamente la solución madre con dimetil sulfóxido para obtener concentraciones de 12.8, 16, 20, 25 y 31.2 µg/mL antes de realizar las diluciones de prueba.</p> <p><u>La Dilución de prueba de la muestra debe contener la misma cantidad de dimetil sulfóxido que las diluciones de la sustancia de referencia.</u></p> <p>(3) Para bacitracina zinc, cada una de las diluciones de prueba deben contener la misma cantidad de ácido clorhídrico que la <u>Dilución de prueba de la muestra</u>.</p> <p>(4) Para la valoración turbidimétrica de neomicina, diluir la solución madre de 100 µg/mL en forma</p>				



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>cuantitativa con <i>Solución amortiguadora n.º 3</i> para obtener una solución con una concentración equivalente a <math>25.0 \mu\text{g/mL}</math> de neomicina. A matraces volumétricos de <math>50 \text{ mL}</math> separados, agregar <math>1.39, 1.67, 2.00, 2.40</math> y <math>2.88 \text{ mL}</math> de esta solución, agregar <math>5.0 \text{ mL}</math> de ácido clorhídrico <math>0.01 \text{ N}</math> a cada matraz, diluir a volumen con <i>Solución amortiguadora n.º 3</i> y mezclar para obtener soluciones con concentraciones de <math>0.69, 0.83, 1.0, 1.2</math> y <math>1.44 \mu\text{g/mL}</math> de neomicina. Utilizar estas soluciones para preparar la línea de respuesta de la sustancia de referencia.</p> <p>(5) Para la nistatina, diluir nuevamente la solución madre con dimetilformamida para obtener concentraciones de <math>256, 320, 400, 500</math> y <math>624 \text{ Unidades/mL}</math> antes de realizar las diluciones de prueba. Preparar las soluciones de línea de respuesta de la sustancia de referencia simultáneamente con las diluciones de la muestra que se desea analizar. La Dilución de prueba de la muestra debe contener la misma cantidad de dimetilformamida que las diluciones de prueba de la sustancia de referencia. Utilizar recipientes de vidrio con protección actínica.</p> <p>(6) Para la Polimixina B, preparar la solución madre añadiendo <math>2 \text{ mL}</math> de agua por cada <math>5 \text{ mg}</math> de la sustancia de referencia.</p>		
<i>Tabla 0100.6. Capa base.</i>		
<b>Antibiótico</b>	<b>Medio</b>	<b>Volumen (mL)</b>



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Dice	Debe decir	Justificación*		
Ampicilina 1	21			
Amfotericina-B NR	NR			
Bacitracina-zinc 2	21			
Bleomicina 35	10			
Carbenicilina 9	21			
Cefalotina 2	21			
Gloxacilina 2	21			
Golistina 9	21			
Eritromicina 11	21			
Gentamicina 11	21			
Neomicina 11	21			
Netilmicina 11	20			
Nistatina NR	NR			
Paromomicina 11	21			
Penicilina-G 2	21			
Polimixina-B 9	21			
Rifampicina 2	21			
Vancomicina 8	10			
<i>Tabla 0100.7. Capa siembra y condiciones de incubación.</i>				
Antibiótico	Medio	Volumen (mL)	Condiciones de incubación (°C)	
Ampicilina	1	4	32-35	
Amfotericina-B	19	8	29-31	
Bacitracina	1	4	32-35	
Bleomicina	35	6	32-35	
Carbenicilina	10	4	36-37.5	



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Dice	Debe decir	Justificación*
Gefalotina 1 4 32-35		
Gloxacilina 1 4 32-35		
Golisistina 10 4 36-37.5		
Eritromicina 11 4 32-35		
Gentamicina 11 4 36-37.5		
Neomicina <sup>(1)</sup> 11 4 36-37.5		
Netilmicina 11 5 36-37.5		
Nistatina 19 8 29-31		
Paromomicina 11 4 36-37.5		
Penicilina G 1 4 32-35		
Polimixina-B 10 4 36-37.5		
Rifampicina 2 4 32-35		
Vancomicina 8 4 36-37.5		
<i>(1) Se puede usar la valoración turbidimétrica como un procedimiento alternativo.</i>		
<b>Cálculos.</b> Para calcular la actividad utilizar un método estadístico apropiado (consultar el capítulo de <i>Estadística para ensayos biológicos</i> ), comúnmente se utiliza un procedimiento analítico basado en la interpolación de una recta patrón obtenido por transformación logarítmica y ajustada por cuadrados mínimos. Deben ser considerados tres conceptos esenciales al interpretar los resultados de potencia del antibiótico.		
1. Las relaciones biológicas de dosis-respuesta por lo general no son lineales. El método de potencia de antibióticos permite ajustar los datos a una línea recta,		



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>evaluando un intervalo de concentración estrecho en el que los resultados se acercan a la linealidad. Los resultados de la valoración se consideran válidos únicamente si la potencia calculada es de 80 a 125 % de la potencia asumida al preparar la solución madre de la muestra. Cuando la potencia calculada se encuentra fuera de dicho intervalo se debe ajustar la potencia asumida de la muestra según corresponda y repetir la valoración para obtener un resultado válido.</p>		
<p>2. La manera más efectiva para reducir la variabilidad del valor de informe (media geométrica de la potencia de todos los ensayos y duplicados) son los ensayos independientes del proceso de valoración. Una serie de valoraciones independientes pequeñas realizada a lo largo de varios días genera resultados que al ser combinados son una estimación de potencia más confiables que la obtenida de una sola valoración grande con la misma cantidad de placas. Son necesarias tres o más valoraciones independientes para la determinación de potencia de antibióticos.</p>		
<p>3. El número de valoraciones requeridas para obtener una estimación confiable de potencia de antibióticos depende del intervalo de especificación requerido y la variabilidad de la valoración.</p>		



*“2026, Año de Margarita Maza Parada”*

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>El cálculo del límite de confianza (descrito más adelante) se determina a partir de logaritmos de las potencias que son aproximadamente iguales en precisión. Si el valor calculado para la amplitud del intervalo de confianza W es demasiado amplio, no será posible tomar una decisión útil con respecto a si la potencia cumple con su especificación.</p> <p>Cada laboratorio debe establecer en los procedimientos operativos de forma inicial el valor máximo aceptable para la amplitud del intervalo de confianza. El valor máximo se debe determinar durante el desarrollo y confirmarse en la validación e aplicabilidad.</p> <p>Si el intervalo de confianza calculado excede este límite, el analista debe realizar determinaciones de potencias adicionales para cumplir con el requisito del límite.</p> <p>Se debe tomar en cuenta que la decisión de realizar determinaciones adicionales no depende de la potencia estimada, sino únicamente de la incertidumbre en dicha estimación, según lo determina la amplitud del intervalo de confianza.</p> <p>La variabilidad de la valoración tiene un impacto mayor en el límite de confianza calculado que el número de determinaciones de potencia independientes. Por lo que se debe considerar reducir la variabilidad en la medida de lo posible antes de realizar determinaciones de potencia.</p>		
<p><b>Valoración cilindro – placa.</b> Se describe el análisis de los valores obtenidos para determinar la potencia en la muestra.</p> <p><b>Datos de muestra.</b> Para exemplificar el cálculo de</p>		



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>potencia usaremos los resultados de la valoración que se muestra en la tabla 0100.8.</p> <p><b>Paso 1.</b> Considerando que se tienen nueve datos de cada suma de las diluciones del SRef (a, b, d, e) y nueve de la muestra (m). En el caso de la concentración central (c) se cuenta con 36 valores. En todos los casos se debe determinar el promedio <del>X</del>, desviación estándar (<math>\sigma</math>) y coeficiente de variación (CV).</p> <p>Ejemplo: Para la dilución de la SRef "a":</p> $\bar{x}_a = \frac{(12.6 + 13.0 + 12.8 + 13.0 + 12.8)}{9}$ $\bar{x}_a = 12.82$ $\sigma_a = \sqrt{\frac{(A)^2 + (B)^2 + (C)^2 + (D)^2 + (E)^2}{9}}$ $\sigma_a = 0.47$ $A = (12.6 - 12.82)$ $B = (13.0 - 12.82)$ $C = (12.8 - 12.82)$ $D = (13.0 - 12.82)$ $E = (12.8 - 12.82)$ $F = (12.6 - 12.82)$ $G = (12.0 - 12.82)$ $H = (13.8 - 12.82)$ $I = (12.8 - 12.82)$		



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Dice	Debe decir	Justificación*
$CV_a = (0.47 / 12.82) \times 100 = 3.7\%$		
-		
Para el criterio de aptitud de variabilidad, cada laboratorio debe determinar un valor máximo aceptable para el coeficiente de variación. Si alguno de los ocho valores del coeficiente de variación (cuatro para la SRef ("c") y cuatro de las otras diluciones SRef "a,b, d y e") sobrepasan este máximo predeterminado, los datos de la valoración no son adecuados y deben desecharse. [El límite sugerido para el coeficiente de variación (CV) es, no más de 10%].		
<b>Soluciones</b> Conc ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\bar{x}$ $\sigma$ CV		
(c <sub>a</sub> ) 1    14.44    0.24    1.7 a    0.64    12.82    0.47    3.7 (c <sub>b</sub> ) 1    14.53    0.54    3.7 b    0.8    13.69    0.32    2.3 (c <sub>d</sub> ) 1    14.8    0.55    3.7 d    1.25    15.29    0.33    2.2 (c <sub>e</sub> ) 1    14.44    0.34    2.4 e    1.56    15.87    0.51    3.2		
<b>Paso 2.</b> Realizar una corrección de variación de los valores de halos de inhibición de la curva tipo del SRef. La corrección es aplicada para convertir la medición de zona promedio obtenida para cada concentración al valor que se obtendría si la		



"2026, Año de Margarita Maza Parada"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>medición de la concentración de referencia promedio para dicho conjunto de tres placas repetidas fuera la misma que el valor del punto de corrección (<math>C_{36}</math>).</p> <p><u><math>[Dil.SRef_{corregida}] (a,b,d,e) = X_{a,b,d,e} - C_{36}</math></u></p> <p>Dónde:</p> <p><u><math>[Dil.SRef_{corregida}]</math></u> = Valor de la dilución de la solución de referencia corregida (<math>a, b, d, e</math>).</p> <p><u><math>X_{a,b,d,e}</math></u> = Media original de <math>a, b, d, e</math>.</p> <p><u><math>C_{36}</math></u> = Media de la concentración <math>c</math> en cada una de las diluciones (<math>c_a, c_b, c_d, c_e</math>)</p> <p><u><math>c_{36}</math></u> = Promedio de los 36 valores obtenidos de <math>c</math> en la valoración.</p> <p><u>Ejemplo:</u> Para el primer conjunto de tres placas en la solución de referencia (<math>a</math>), la corrección es la siguiente:</p> <p><u><math>a = 14.17 - (15.72 - 15.87) = 14.022</math></u></p>		
<p><b>Paso 3:</b> Determinar la línea recta de la curva tipo. Generar la línea de la curva tipo graficando las mediciones corregidas de la zona de inhibición en función del logaritmo de los valores de la concentración de la SRef. Calcular la ecuación de la línea de la curva tipo, realizando una regresión lineal no ponderada estándar sobre estos valores, usando un software apropiado o las indicaciones del capítulo de Estadística para ensayos biológicos.</p> <p><b>Nota:</b> usar el logaritmo natural o el logaritmo en base 10 para graficar la curva tipo y determinar la ecuación de regresión; ambos proporcionan el</p>		



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Dice	Debe decir	Justificación*				
<p>mismo resultado de prueba final.            Cada laboratorio debe determinar un valor mínimo del coeficiente de determinación (<math>\% R^2</math>) para una regresión aceptable, esto ocurre solo si el <math>\% R^2</math> obtenido excede el valor predeterminado. La regresión es aceptable solo si el <math>\% R^2</math> obtenido excede el valor predeterminado.  <del>[El límite sugerido para el coeficiente porcentual de determinación es no menos de 95 %]</del></p> <p><b>Ejemplo: Paso 1.</b> Determinar <math>\bar{x}</math>, <math>\sigma</math> y <math>CV</math>, en la curva tipo de la SRef y en la muestra</p> <p>-</p> <p>-</p>						
Tabla 0100.8. Ejemplificación de (Valoración Cilindro—Placa). Curva tipo de la SRef.						
Soluciones	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Placa 1 (mm)	Placa 2 (mm)	Placa 3 (mm)	$\bar{x}$	$CV$
(c <sub>a</sub> )	1.00	14.2 14.8 14.4	14.8 14.2 14.4	14.2 14.6 14.4	14.44	0.24 1.7
a	0.64	12.6 13.0 12.8	13.0 12.8 12.6	12.0 13.8 12.8	12.82	0.47 3.7
(c <sub>b</sub> )	1.00	14.4 14.6 14.8	14.8 14.0 14.8	13.4 14.8 15.2	14.53	0.54 3.7
b	0.80	13.8 13.8 14.2	13.2 13.4 13.8	13.4 13.6 14.0	13.69	0.32 2.3
(c <sub>d</sub> )	1.00	15.6 15.2 15.0	14.2 14.8 14.2	15.2 15.0 14.0	14.80	0.55 3.7
d	1.25	15.2 15.8 15.6	15.4 15.4 14.8	15.2 14.8 15.4	15.29	0.33 2.2
(c <sub>e</sub> )	1.00	14.6 14.6 15.0	14.0 14.8 14.0	14.4 14.2 14.4	14.44	0.34 2.4
e	1.56	16.2 16.4 15.6	16.0 15.4 15.6	16.6 16.0 15.0	15.87	0.51 3.2
G <sub>36</sub>					14.56	0.168 1.2
-						
<b>Muestra</b>						



"2026, Año de Margarita Maza Parada"

Dice			Debe decir						Justificación*				
Soluciones	Placa 1 (mm)	Placa 2 (mm)	Placa 3 (mm)	σ	CV								
(e) m	14.4 14.8	14.6 14.4	14.9 14.3	14.9 14.2	14.3 14.8	14.7 14.1	14.8 14.8	14.2 14.5	14.0 14.1	14.53 14.44	0.32 0.30	2.23 2.05	
X : Promedio σ : Desviación estándar CV: Coeficiente de variación													
Ejemplo Paso 2. Efectuar la corrección de los halos de inhibición de la curva tipo de la SRef y de la muestra.													
Corrección de los halos de inhibición de la SRef (mm)													
a = 12.82 - (14.44 - 14.56) = 12.93													
b = 13.69 - (14.53 - 14.56) = 13.71													
d = 15.29 - (14.80 - 14.56) = 15.04													
e = 15.87 - (14.44 - 14.56) = 15.98													
m = 14.44 - (14.53 - 14.56) = 14.47													
Datos a graficar													
-													
- x → y a = log(0.64)12.93 b = log(0.80)13.71 c = log(1.00)14.56 d = log(1.25)15.04 e = log(1.56)15.98													
Ejemplo Paso 3. Considerando la concentración teórica de cada una de las diluciones determinar, con ayuda de un programa de cómputo, la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ); donde el eje de las abscisas (x) corresponde al logaritmo de la concentración de													



"2026, Año de Margarita Maza Parada"

Dice	Debe decir	Justificación*												
las diluciones del SRef (a, b, c, d, e) y el eje de las ordenadas (y) el halo de inhibición.														
<u>Figura 0100.1. Gráfica de curva tipo, valoración cilindro placa.</u> $\% R^2 = 99.3$ Pendiente $(b) = 7.6695$ Ordenada al origen $(a) = 14.446$ <u>Despeje de la ecuación:</u> $(x) = \text{Antilog}[(y - 14.446)/7.6695]$														
Ejemplo: La tabla 0100.9 resume la porción de la tabla 0100.8 requerida para esta parte del cálculo.														
Tabla 0100.9. Datos para calcular la ecuación de la recta.														
<u>Curva tipo Zona de inhibición Concentración de la SRef Corregida (mm) (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</u> <table border="1"> <tr> <td>a</td> <td>12.93</td> <td>0.64</td> </tr> <tr> <td>b</td> <td>13.71</td> <td>0.80</td> </tr> <tr> <td>c</td> <td>14.56</td> <td>1.00</td> </tr> <tr> <td>d</td> <td>15.04</td> <td>1.25</td> </tr> </table>	a	12.93	0.64	b	13.71	0.80	c	14.56	1.00	d	15.04	1.25		
a	12.93	0.64												
b	13.71	0.80												
c	14.56	1.00												
d	15.04	1.25												



"2026, Año de Margarita Maza Parada"

Dice	Debe decir	Justificación*
e      15.98      1.56 - Resultados de la regresión lineal Línea de la curva tipo: $y = [ 7.6695 \times \log (X) ] + 14.446$ $y = \text{Medición de zona corregida}$ $x = \text{Concentración}$ $\% R^2 = 99.3$		
<del>Determinación de potencia de la muestra. Para estimar la potencia de la muestra desconocida, promediar las mediciones de la zona de la sustancia de referencia y las mediciones de la zona de la muestra en las tres placas usadas. Corregir por variación entre placas, usando el punto de corrección determinado anteriormente para obtener un promedio corregido para la muestra desconocida "m".</del> <del>Nota: un método alternativo aceptable al uso del punto de corrección consiste en corregir usando el valor en la línea de regresión estimada correspondiente al logaritmo de la concentración de c.</del> <del>Usar la medición de zona promedio corregida en la ecuación de la línea de la curva tipo para determinar el logaritmo de la concentración de la muestra, <math>\log(m)</math>, mediante:</del> $\log(m) = (m - a) / b$		



"2026, Año de Margarita Maza Parada"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p><u>Donde:</u>  <math>\log(m)</math> = Logaritmo de la concentración  <math>m</math> = Muestra desconocida.  <math>a</math> = Ordenada al origen (Intersección de  <math>b</math> = Pendiente de la línea de regresión.</p>		
<p>Para obtener la potencia de la muestra desconocida, tomar el antilogaritmo de <math>\log(m)</math> y multiplicar el resultado por cualquier factor de dilución aplicable. Este valor también se puede expresar como porcentaje del valor de la concentración de referencia.</p>		
<p><u>Ejemplo:</u> Medición corregida de la zona de la muestra (véase tabla 0.100.8).</p>		
$m_{corregida} = 14.44 - (14.53 - 14.56) =$		
<p>Logaritmo en base 10 de la concentración de la muestra:</p>		
$\log(m) = (14.47 - 14.446) / 7.6695 =$		
<p>Concentración de la muestra:</p>		
$\text{Antilog } \log(m) = \text{Antilog } 0.003129 = 1$		
<p>Porcentaje de concentración de referencia:</p>		
$\text{Resultado} = (1.007 / 1.00) \times 100 = 100$		
<p><b>MÉTODO TURBIDIMÉTRICO</b>  <u>Control de temperatura.</u> Usar un equipo calificado y calibrado de manera apropiada para obtener los márgenes de temperatura especificados en la tabla 0100.11. El control de temperatura se puede lograr con circulación de aire o agua. La mayor capacidad térmica del agua representa cierta ventaja sobre el aire circulante.</p>		
<p><b>Espectrofotómetro.</b> La medición de la</p>		



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Dice	Debe decir	Justificación*
<p><del>absorbancia o transmitancia dentro de una banda de frecuencia muy estrecha requiere un espectrofotómetro adecuado en el que se pueda variar o restringir la longitud de onda usando filtros de 580 o 530 nm. Como alternativa, se puede usar un espectrofotómetro con longitud de onda variable y ajustar a una longitud de onda de 580 o 530 nm. Ajustar automáticamente el instrumento a cero con el medio de cultivo no inoculado, preparado según las indicaciones de cada antibiótico, conteniendo la misma cantidad de dilución de prueba (incluyendo formaldehido, si se indica) que se encuentra en cada muestra.</del></p> <p><del>Durante la preparación del inóculo se puede medir tanto absorbancia como transmitancia.</del></p> <p><del>En el espectrofotómetro usar celdas o tubos idénticos exentos de defectos y ralladura. Las celdas y tubos utilizados en la prueba deben lavarse minuciosamente para eliminar los residuos de antibiótico y restos de soluciones de limpieza.</del></p> <p><del>Utilizando ciclos validados, esterilizar los tubos antes de usar.</del></p> <p><b>Preparación de las diluciones de la SRef.</b> Para cada sustancia de referencia consultar las condiciones de secado en la etiqueta. Para cada antibiótico enlistado en la tabla 0100.10 seleccionar, disolvente, diluyentes y concentración madre de la sustancia de referencia. Considerando la concentración central ("c") indicada en la misma tabla y utilizando el factor de dilución 1:1.25, preparar las cinco concentraciones de la curva, dos por debajo ("a"), ("b") y dos por</p>		



"2026, Año de Margarita Maza Parada"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>arriba ("d"), ("e") de la concentración media.</p> <p><b>Preparación de la muestra.</b> Asignar una potencia por unidad de peso o volumen a la muestra desconocida, el día de la valoración preparar una solución madre de la misma forma que se indica para la solución de referencia <i>tabla 0100.10</i>. Diluir la solución madre de la muestra en el diluyente final especificado hasta llegar a la concentración central de la Solución de referencia, según se indica en la <i>tabla 0100.10</i>.</p> <p><b>Inóculo.</b> A partir de un cultivo reciente suspender en 3 mL de solución salina estéril, para facilitar la suspensión del microorganismo de prueba usar perlas de vidrio estériles. <i>Enterococcus hirae</i> (ATCC 10541) y <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 9144) se cultivan en medio líquido no en agar. Espesar la suspensión del organismo de prueba sobre la superficie de dos o más placas de agar o sobre la superficie de una botella de Roux que contenga 250 mL del medio indicado (véase <i>tabla 0100.11</i>). Incubar durante el tiempo y a la temperatura especificada en la <i>tabla 0100.11</i> hasta que el crecimiento sea evidente. Despues de incubar, recolectar el microorganismo de las placas o de la botella de Roux con aproximadamente 50 mL de solución salina estéril, usando una varilla de vidrio estéril doblada en ángulo recto o perlas de vidrio estériles. Con pipeta estéril transferir la suspensión a un frasco de vidrio estéril. Esta es la suspensión de recolección. Durante la verificación del método utilizando el volumen sugerido en la <i>tabla 0100.11</i>, determinar</p>		



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>el volumen de suspensión de recolección que se usará como inóculo. Preparar un tubo extra con la concentración ("c"), que servirá como prueba de crecimiento.</p> <p>Incubar las pruebas durante los tiempos y temperatura indicados en la tabla 0100.12.</p> <p>Si es necesario ajustar la cantidad de inóculo a diario para obtener una relación dosis-respuesta. Concluidos los períodos de incubación especificados, los tubos que contienen la concentración central de la solución de referencia ("c") deben presentar valores de transmitancia especificados en la Tabla 0100.13.</p> <p>Determinar la duración exacta de la incubación observando el crecimiento en la concentración central ("c") de la solución de referencia.</p> <p><b>Procedimiento para la prueba.</b> Para cada antibiótico enlistado en la tabla 0100.11, seleccionar el microorganismo de prueba, medio de cultivo, volumen de inóculo sugerido para cada 100 mL de medio de cultivo.</p> <p>Para la curva dosis respuesta usar 15 tubos (cinco series de tres tubos cada una) y para la muestra usar tres tubos.</p> <p>A cada serie de tres tubos adicionar 1.0 mL (o 0.1 mL en el caso de la gramicidina, tioestreptón y tilosina) de cada concentración de la curva dosis respuesta y en el caso de la muestra, adicionar a cada uno de los tres tubos 1.0 mL de la concentración media. Incluir de manera similar en cada gradilla uno o dos tubos control que contengan 1 mL del diluyente de prueba, pero no</p>		



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Dice	Debe decir	Justificación*
<p><del>antibiótico.</del>  <del>Adicionar a cada serie de tres tubos (curva dosis respuesta, muestra y control) 9.0 mL del medio de cultivo inoculado y colocar de inmediato en baño de agua con agitación continua a la temperatura indicada en la tabla 0100.11. El tiempo de incubación se detiene cuando en los tubos que contienen la concentración central ("c") de la SRef se observa una turbiedad cercana al 50 por ciento de transmittancia o 0.3 absorbancia (de 2 a 5 h).</del>  <del>Retirar los tubos del baño y adicionar inmediatamente a cada uno 0.5 mL de una solución de formaldehído 1:3. Llevar la gradilla a temperatura ambiente. Ajustar el espectrofotómetro a 100 por ciento de transmittancia con un blanco que contiene medio de cultivo sin inocular y 0.5 mL de solución de formaldehído a la concentración indicada. Leer la transmittancia de cada tubo a una longitud de onda de 530 a 580 nm y promediar los valores obtenidos. Analizar una gradilla cada vez.</del>  <del>Tabla 0100.10. Preparación de la solución madre y diluciones de prueba de la SRef (método turbidimétrico)<sup>b</sup></del></p>		
<p><b>Solución madre</b></p> <p><b>Disolvente inicial,</b>  <b>(y concentración inicial donde se especifique)</b></p> <p><b>Antibiótico</b></p>	<p><b>Dilución de prueba</b></p> <p><b>Cone. final de la solución</b></p> <p><b>Duración en refrigeración</b></p> <p><b>Diluyente final</b></p>	<p><b>Cone. media (unidades o <math>\mu\text{g/mL}</math>) (c)<sup>a</sup></b></p>
Amikacina	Agua 1 mg	14 días Agua 10 $\mu\text{g}$



"2026, Año de Margarita Maza Parada"

Dice	Debe decir	Justificación*					
Cloranfenicol Alcohol (10 mg/mL); [Agua] 1 mg	30 días Agua 2.5 µg						
Clortetraciclina Ácido clorhídrico 0.01 N 1 mg	4 días Agua 0.06 µg						
Demeclociclina Ácido clorhídrico 0.1 N 1 mg	4 días Agua 0.1 µg						
Doxiciclina Ácido clorhídrico 0.1 N 1 mg	5 días Agua 0.1 µg						
Estreptomicina Agua 1 mg	30 días Agua 30 µg						
Gramicidina Alcohol 95 % 1 mg	30 días Alcohol 95 % 0.04 µg						
Kanamicina Agua 1 mg	30 días Agua 10 µg						
Neomicina <sup>d</sup> B.3 <sup>c</sup> 100 µg	14 días B.3 1.0 µg						
Oxitetraciclina Ácido clorhídrico 0.1 N 1 mg	4 días Agua 0.24 µg						
Tetraciclina Ácido clorhídrico 0.1 N 1 mg	1 día Agua 0.24 µg						
Trobamicina Agua 1 mg	14 días Agua 2.5 µg						
<sup>a</sup> Microgramos (µg) en esta columna se refiere a microgramos de actividad.							
<sup>b</sup> Se puede usar la valoración en cilindro placa como un procedimiento alternativo.							
<sup>c</sup> La letra B se refiere a la solución amortiguadora. Véase <i>Medios y Soluciones, Soluciones amortiguadoras para una descripción de cada solución amortiguadora</i> listada en esta tabla.							
<sup>d</sup> Diluir la solución madre de 100 µg/mL con Solución amortiguadora B.3 para obtener una solución con una concentración equivalente a 25 µg/mL de Neomicina. Agregar 1.39; 1.67; 2.00; 2.40 y 2.88 mL de esta solución a matrazes volumétricos de 50 mL. Agregar 5.0 mL de ácido clorhídrico 0.01 N a cada matraz, diluir con Solución amortiguadora B.3 a volumen y mezclar para obtener soluciones con concentraciones de 0.69; 0.83; 1.0; 1.2 y 1.44 µg/mL de neomicina. Usar estas soluciones para preparar la curva tipo de la sustancia de referencia.							
Tabla 0100.11. Microorganismo de prueba para valoración turbidimétrica.							
Antibiótico	Condiciones de incubación		Composición sugerida del inóculo				
	Organismo de prueba	Número de ATCC <sup>a</sup>	Medio <sup>b</sup>	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Medio <sup>b</sup>	Cantidad (mL/100 mL)
Amikacina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	4	32 a 35	24	3	0.1



"2026, Año de Margarita Maza Parada"

Dice			Debe decir			Justificación*	
Gloranfenicol	<i>Escherichia coli</i>	10536	1	32 a 35	24	3	0.7
Clortetraiclin a	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	1	32 a 35	24	3	0.1
Demeclociclin a	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	1	32 a 35	24	3	0.1
Doxiciclina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	1	32 a 35	24	3	0.1
Estreptomicina a	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031	1	36 a 37.5	16 - 24	3	0.1
Gramicidina	<i>Enterococcus hirae</i>	10541	3	36 a 37.5	16 - 18	3	4
Kanamicina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	1	32 a 35	24	3	0.2
Metaciclina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	1	32 a 35	24	3	0.1
Neomicina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031	1	36 a 37.5	16 - 24	39	2
Oxitetraciclina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	1	32 a 35	24	3	0.1
Tetraciclina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	1	32 a 35	24	3	0.1
Trobamicina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	1	32 a 35	24	3	0.15
<sup>a</sup> American	Type		Culture		Collection		
b) Véase Medios y soluciones.							
Tabla 0100.12. Incubación de la prueba.							
Antibiótico	%Transmitancia						
Amikacina	3 a 4						
Gloranfenicol	3 a 4						
Clortetraicicina	4 a 5						



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Dice	Debe decir	Justificación*
Demeclociclina 3 a 4		
Doxiciclina 4 a 5		
Estreptomicina 4 a 5		
Gramicidina 4 a 5		
Kanamicina 4 a 5		
Neomicina 4 a 5		
Oxitetraciclina 4 a 5		
Tetraciclina 4 a 5		
Trobamicina 4 a 5		
<i>Tabla 0100.13. Valores de transmitancia para detener el crecimiento.</i>		
<b>Antibiótico % Transmitancia</b>		
Amikacina 50		
Gloranfenicol 50		
Clortetraciclina 45		
Demeclociclina 50		
Doxiciclina 50		
Estreptomicina 50		
Gramicidina 45		
Kanamicina 50		
Neomicina 50		
Tetraciclina 45		
Trobamicina 50		
<b>Cálculo.</b>		
<i>Datos de la muestra. La tabla 0100.14 presenta los datos de una valoración que se usarán como ejemplo a lo largo de esta sección.</i>		
<b>Paso 1. Realizar los cálculos iniciales y la verificación de la aptitud de variabilidad. Para cada</b>		



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Dice	Debe decir	Justificación*
concentración (incluyendo la muestra), promediar los tres valores de transmitancia. <i>Ejemplo: véase "a" en la tabla 0100.14.</i> $0.8612 = \bar{x} (0.8650, 0.8540, 0.8450)$		
Para cada concentración, determinar la desviación estándar de las tres lecturas y una desviación estándar combinada de las concentraciones. <i>Ejemplo: véase ( a ) en la tabla 0100.14.</i> $31.486 = \sigma (30.989, 31.679 ; 31.789)$		
El valor combinado se calcula tomando la raíz cuadrada del promedio de las cinco varianzas: $\sqrt{[(0.434)^2 + (2.698)^2 + (1.144)^2 + (1.2$		
<i>Tabla 0100.14. Datos de la muestra (valoración turbidimétrica).</i>		
<i>Figura 0100.2. Gráfica de curva tipo, valoración turbidimétrica.</i>		
-		



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>Para el criterio de aptitud de variabilidad, se debe determinar una desviación estándar combinada máxima aceptable. Si la desviación estándar excede este máximo predeterminado, los datos de valoración no son adecuados y se deben descartar.</p> <p><b>Nota:</b> el límite sugerido para desviación estándar combinada es no más de 10 % del valor de transmitancia promedio a través de las cinco concentraciones. Si el número de determinaciones repetidas por concentración es al menos cinco, entonces se puede calcular el coeficiente de variación para cada concentración después de verificar valores atípicos y comparar con un coeficiente de variación máximo aceptable.</p> <p><b>Nota:</b> el límite sugerido para el coeficiente de variación es no más de 10 %.</p>		
<p><b>Paso 2:</b> Determinar la línea de la curva tipo. Generar la línea de la curva tipo, graficando los valores de transmitancia promedio en función del logaritmo de los valores de concentración de la SRef. Calcular la ecuación de la línea de la curva tipo, realizando una regresión lineal no ponderada sobre estos valores usando software apropiado o las indicaciones del capítulo de "Estadística para ensayos biológicos".</p> <p><b>Nota:</b> usar el logaritmo natural o el logaritmo en base 10 para graficar la curva tipo y determinar la ecuación de regresión; ambos proporcionan el mismo resultado de prueba final. Se debe determinar un valor mínimo del coeficiente porcentual de determinación (% <math>R^2</math>) para una</p>		



"2026, Año de Margarita Maza Parada"

Dice	Debe decir	Justificación*																		
<p>regresión aceptable. La regresión es aceptable únicamente si el valor % <math>R^2</math> obtenido excede este valor predeterminado.</p> <p><b>Nota:</b> el límite sugerido para el coeficiente porcentual de determinación es no menos de 90 %.</p> <p><b>Ejemplo:</b> La tabla 0100.15 resume la porción de la tabla 0100.14 requerida para esta parte del cálculo.</p> <p>Tabla 0100.15. Valores para obtener la línea de la recta.</p>																				
<p><b>Curva tipo</b> Valores Promedio de Concentración % Transmitancia (% T) (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</p> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>a</td> <td>31.486</td> <td>64</td> </tr> <tr> <td>b</td> <td>43.371</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>c</td> <td>52.576</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>d</td> <td>62.380</td> <td>125</td> </tr> <tr> <td>e</td> <td>70.645</td> <td>156</td> </tr> <tr> <td>-</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p><b>Resultados de la regresión lineal</b> Línea de la curva tipo de la SRef</p> <p><math>\text{Transmitancia} = 149.06 - [43.682 \times L]</math></p> <p>% <math>R^2 = 99.6 \%</math></p> <p>-</p> <p>Determinación de la potencia de la muestra: Para estimar la potencia de la muestra desconocida, promediar las tres mediciones de transmitancia para obtener un promedio para la muestra desconocida, <math>m</math>. Usar esta medición promedio en la ecuación de la línea de la curva tipo para</p>	a	31.486	64	b	43.371	80	c	52.576	100	d	62.380	125	e	70.645	156	-				
a	31.486	64																		
b	43.371	80																		
c	52.576	100																		
d	62.380	125																		
e	70.645	156																		
-																				



"2026, Año de Margarita Maza Parada"

Dice	Debe decir	Justificación*
determinar el logaritmo natural de la concentración de la muestra desconocida, $L_m$ mediante:		
$L_m = (m - a) / b$		
Donde: a = Intersección de la línea de regresión. b = Pendiente de la línea de regresión.		
Para obtener la potencia de la muestra desconocida, tomar el exponente y multiplicar el resultado por cualquier factor de dilución aplicable. Este valor también se puede expresar como porcentaje del valor de la concentración de referencia.		
Ejemplo: % Trasmitancia promedio de la muestra (véase tabla 0100.13) = 50.608		
$C_m = \frac{(50.608 - 43.682)}{(-149.06)}$ $C_m = -0.04646$ $e^{-0.04646} = 0.9545$		
Donde: $C_m$ = Concentración de la muestra. Porcentaje de concentración de referencia = $(0.9545 / 1.00) \times 100\% = 95.11\%$		
-		
<b>Límites de confianza y combinación de los cálculos de las valoraciones.</b> Debido a la variabilidad de la potencia de la muestra para cada determinación independiente, comenzar con soluciones madres y diluciones de prueba tanto de la SRef como de la muestra, preparadas por		



"2026, Año de Margarita Maza Parada"

Dice	Debe decir	Justificación*
separado, y repetir la valoración de una muestra determinada otro día.		
Para verificar valores atípicos, utilizar el procedimiento indicado en el capítulo de "Estadística para ensayos biológicos". Para obtener una estimación combinada de la potencia desconocida, calcular el promedio, $M$ , y la desviación estándar de los logaritmos de las potencias aceptadas. <b>Nota:</b> usar el logaritmo natural o el logaritmo en base 10. Determinar el intervalo de confianza para la potencia, según se indica a continuación:		
<del>Antilog [M - t (0.05, N - 1) x σ / √N]</del> , <del>Antilog [M + t (0.05, N - 1) x σ / √N]</del>		
Donde: $M$ = Promedio $\sigma$ = Desviación estándar $N$ = Número de valoraciones. $T (0.05, N - 1)$ = el punto del 5 % de las colas de una distribución $t$ de Student con $N - 1$ grados de libertad. <b>Nota:</b> el valor $t$ está disponible en hojas de cálculo, textos estadísticos y software estadístico.		
$W = \text{antilog} [t (0.05, N - 1) x s / \sqrt{N}]$		
Donde: $W$ = Mitad de la amplitud del intervalo de confianza. Comparar la mitad de la amplitud del intervalo de confianza con un valor máximo predeterminado		



"2026, Año de Margarita Maza Parada"

Dice	Debe decir	Justificación*
aceptable. Si la mitad de la amplitud es mayor que el límite de aceptación, continuar con valoraciones adicionales.		
Ejemplo: suponer que la muestra se valora cuatro veces, con resultados de potencia en la escala logarítmica natural de 1.561 ; 1.444; 1.517; 1.535 . Entonces: $N = 4$ $M = \bar{X} (1.561; 1.444; 1.517; 1.535) = 1$ $\sigma (1.561, 1.444, 1.517, 1.535) = 0.050$ $t = 3.182$		
-		
El intervalo de confianza en la escala logarítmica es $1.514 + (3.812 \times 0.05 / \sqrt{4}) = (1.434,$ Tomando antilogaritmo, la potencia estimada es $e^{1.514} = 4.546$		
con un intervalo de confianza de 95 % para la potencia de $e^{1.514}$ , $e^{1.594} = (4.197; 4.924)$		
La mitad de la amplitud del intervalo de confianza para comparar con un valor de aceptación es el cociente $4.924 / 4.46 = 1.104$		



*“2026, Año de Margarita Maza Parada”*

La potencia o actividad de un antibiótico se calcula comparando el grado de inhibición de crecimiento de un microorganismo sensible y específico respecto a una curva tipo de una sustancia de referencia.		
En los antibióticos puede haber ligeros cambios químicos que se traducen en pérdida de actividad antimicrobiana que no pueden demostrarse por métodos químicos, por esta razón, los métodos de valoración microbiológica prevalecen sobre los métodos químicos, respecto a la actividad de un antibiótico		
Existen diferentes métodos estadísticos que se pueden aplicar en la valoración de antibióticos, como lo es el diseño de cuadrado latino, de bloques al azar (1 patrón, 1 muestra a 2 dosis), diseño incompleto desbalanceado en bloques (1 patrón a 5 dosis y 1 muestra a una dosis), modelo de líneas paralelas, etc. (Ver el capítulo <i>Estadística para ensayos biológicos, ensayos de respuesta gradual</i> ). En caso de utilizar alguna de estas técnicas estadísticas, el método de valoración de antibióticos debe validarse por el laboratorio.		
El objetivo del presente capítulo es describir la metodología analítica para la determinación de la concentración de antibióticos por un diseño estadístico incompleto desbalanceado en bloques 5+1, el cual debe ser verificado por el laboratorio.		
Para valorar microbiológicamente un antibiótico, se pueden emplear dos métodos: Método cilindro-placa (método de difusión en agar) y Método turbidimétrico, ambos comparan la respuesta del microorganismo de prueba, frente a una Sustancia		



*“2026, Año de Margarita Maza Parada”*

de referencia de actividad conocida y una muestra, tratadas en las mismas condiciones. En la tabla 0100.1 Se enlistan los antibióticos que requieren ensayos microbiológicos y se especifica el tipo de ensayo.		
<i>Tabla 0100.1. Antibióticos que requieren valoración microbiológica. [VÉASE TABLA AL FINAL]</i>		
<b>MATERIALES Y EQUIPOS</b>		
El material que se usa debe estar limpio y seco, libre de residuos de detergente y antibiótico. En el caso de los cilindros ocasionalmente se requiere una limpieza con un baño de ácido por ejemplo ácido nítrico 2 N o con ácido crómico (véase <i>Limpieza de material de vidrio</i> en el capítulo de <i>Generalidades</i> ). El material en contacto con el microorganismo de prueba debe ser estéril empleando procesos validados.		
<ul style="list-style-type: none"><li>• Cajas de Petri de vidrio o plástico de 20 x 100 mm</li></ul>		
<ul style="list-style-type: none"><li>• Cilindros de acero inoxidable o porcelana con las siguientes dimensiones: Diámetro externo <math>8 \pm 0.1</math> mm Diámetro interno <math>6 \pm 0.1</math> mm Longitud de <math>10 \pm 0.1</math> mm</li></ul>		
<ul style="list-style-type: none"><li>• Tapas de porcelana porosa o de plástico</li></ul>		
<ul style="list-style-type: none"><li>• Material volumétrico de diferente capacidad</li></ul>		
<ul style="list-style-type: none"><li>• Micropipeta</li></ul>		



*“2026, Año de Margarita Maza Parada”*

<ul style="list-style-type: none"><li>Tubos de ensayo estériles de 16 × 125 mm o de 18 × 150 mm, para el método turbidimétrico deben tener un espesor relativamente uniforme, sin defectos ni ralladuras en la superficie. Utilizar ciclos validados, esterilizar los tubos antes de usar.</li><li>Tapas metálicas o de plástico resistentes a la esterilización.</li></ul>		
<ul style="list-style-type: none"><li>Incubadora con termostato capaz de mantener la temperatura con variación no mayor de <math>\pm 0.5</math> °C de la temperatura seleccionada. El equipo debe encontrarse calificado y el instrumento utilizado para el monitoreo de la temperatura debe ser calibrado.</li></ul>		
<ul style="list-style-type: none"><li>Baño de agua o aire caliente con termostato capaz de mantener la temperatura seleccionada con una variación no mayor de <math>\pm 0.1</math> °C. El equipo debe encontrarse calificado y el instrumento utilizado para el monitoreo de la temperatura debe ser calibrado.</li></ul>		
<p><b>Nota:</b> Para el método turbidimétrico, considerar que la mayor capacidad térmica del agua representa cierta ventaja sobre el aire circulante.</p>		
<ul style="list-style-type: none"><li>Espectrofotómetro a una longitud de onda a 530 o 580 nm.</li></ul>		
<p><b>Nota:</b> Para el método turbidimétrico, la medición de la absorbancia o transmitancia dentro de una</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

banda de frecuencia muy estrecha requiere un espectrofotómetro adecuado en el cual se pueda variar o restringir la longitud de onda usando filtros de 580 o 530 nm. Como alternativa, se puede usar un espectrofotómetro con longitud de onda variable y ajustar a una longitud de onda de 580 o 530 nm.		
<ul style="list-style-type: none"><li>• Medidor de zonas de inhibición (comparador óptico o vernier) calibrado.</li></ul>		
<b>SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO</b>		
Preparar los medios de cultivo a partir de mezclas deshidratadas comerciales siguiendo las indicaciones del fabricante. Cuando sea necesario prepararlos a partir de ingredientes, se permiten pequeñas modificaciones siempre y cuando los medios de cultivo presenten propiedades promotoras de crecimiento igual o mayor a los medios aquí descritos (véase <i>tabla 0100.2</i> ).		
Disolver en 1.0 L de agua purificada los ingredientes especificados, determinar el pH, si es necesario, ajustar con soluciones de hidróxido de sodio 1.0 N o ácido clorhídrico 1.0 N, según se requiera para que después de esterilizar se obtenga el pH señalado en la <i>tabla 0100.2</i> . A menos que se tenga otra indicación, esterilizar en autoclave usando ciclos de esterilización validados.		
<b>Soluciones amortiguadoras de fosfato y otras soluciones.</b> Preparar las soluciones amortiguadoras con agua purificada como se indica en la <i>tabla 0100.3</i> , determinar el pH de la solución, si es necesario ajustar con soluciones de ácido fosfórico 18 N o hidróxido de potasio 10 N, según se requiera, para que después de la esterilización se obtenga el pH indicado en cada		



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

caso. A menos que se tenga otra indicación, esterilizar en autoclave usando procesos de esterilización validados.		
<b>Otras soluciones.</b> Para preparar estas soluciones consultar los capítulos de reactivos y soluciones reactivo (SR) y de soluciones volumétricas (SV). Usar agua purificada.		
Como solución salina use solución salina inyectable.		
La solución de formaldehído utilizada en la valoración de antibióticos por método turbidimétrico se prepara diluyendo con agua en una proporción 1:3.		
<i>Tabla 0100.2. Medios de cultivo.</i>		
<i>[VÉASE TABLA AL FINAL]</i>		
<i>Tabla 0100.3. Soluciones amortiguadoras.</i>		
<i>[VÉASE TABLA AL FINAL]</i>		
<b>UNIDADES Y SUSTANCIAS DE REFERENCIA</b>		
La potencia de los antibióticos se designa en unidades internacionales (UI), en microgramos ( $\mu\text{g}$ ) o porcentaje (%) de actividad. En un principio, se consideraba que un antibiótico seleccionado como sustancia de referencia constaba en su totalidad de una sola entidad química, por lo tanto, se le asignaba una potencia de 1 000 $\mu\text{g}/\text{mg}$ . En muchos de estos casos, a medida que los métodos de fabricación y purificación para ciertos antibióticos avanzaron en su desarrollo, fue posible obtener antibióticos con más de 1 000 $\mu\text{g}$ de actividad/mg. Los antibióticos mencionados tenían una actividad equivalente a un número determinado de microgramos de la sustancia de referencia original. No obstante, la mayoría de las		



*“2026, Año de Margarita Maza Parada”*

veces, los microgramos de actividad son numérica y exactamente equivalentes a los microgramos (masa) de la sustancia pura. En ciertas ocasiones, como las citadas a continuación los microgramos de actividad definidos en términos de la sustancia de referencia equivalen a una unidad:		
<ul style="list-style-type: none"><li>• Cuando el antibiótico se presenta como la base libre y en forma de sal, y los microgramos de actividad han sido definidos en términos de una de estas formas.</li></ul>		
<ul style="list-style-type: none"><li>• Cuando el antibiótico consta de un número de componentes que son químicamente similares pero que difieren en actividad antibiótica.</li></ul>		
<ul style="list-style-type: none"><li>• Cuando las potencias de una familia de antibióticos se expresan en términos de una sustancia de referencia que consta de un solo miembro de la familia el cual por sí mismo puede ser heterogéneo. No se debe asumir que los microgramos de actividad corresponden a los microgramos (masa) del antibiótico.</li></ul>		
<b>Métodos de secado de la sustancia de referencia.</b> Para cada sustancia de referencia consultar en la etiqueta las indicaciones de secado y considerar lo descrito en el Capítulo de <i>Generalidades, Sustancias de referencia</i> .		
<b>MICROORGANISMO DE PRUEBA.</b>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

<p>El microorganismo de prueba para cada antibiótico se enlista en la <i>tabla 0100.4</i> para la valoración de cilindro-placa y en la <i>tabla 0100.15</i> para la valoración turbidimétrica. Los microorganismos de prueba se especifican mediante un número de identificación de la <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC). Para asegurar el desempeño aceptable de los microorganismos de prueba, estos se deben almacenar y conservar de manera apropiada. Durante la validación o verificación del método se deben establecer las condiciones de almacenamiento específicas. Si se observa un cambio en las características morfológicas y fisiológicas del microorganismo, desechar los cultivos.</p>		
<p>La conservación, mantenimiento y manejo de los cultivos microbianos debe realizarse de acuerdo a lo señalado en el apéndice VI <i>Conservación, mantenimiento, y manejo de cultivos microbianos: Sistema lote semilla</i>. Se sugiere que los cultivos primarios se desechen después de tres semanas en refrigeración y los cultivos de trabajo después de siete días. O validar el tiempo de resguardo en condiciones de refrigeración.</p>		
<p>En caso de observar crecimiento o desempeño no característico en el microorganismo de prueba, usar nuevos cultivos.</p>		
<p><b>Preparación del inóculo.</b></p>		
<p>Dentro de la preparación de los microorganismos de prueba, se debe considerar las características de cada uno, por lo cual, se sugiere utilizar los siguientes métodos:</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

<p><b>Método 1.</b> Para bacterias Gram negativas y Gram positivas no esporuladas y levaduras.</p> <p>A partir de un cultivo reciente del microorganismo de prueba apropiado en tubo con agar inclinado o placa (<i>tabla 0100.4</i> o <i>tabla 0100.5</i>) preparar la suspensión de prueba, agregar 3 mL de solución salina estéril (o medio 34 para cultivos de <i>Mycobacterium smegmatis</i>) para resuspender el crecimiento. Inocular con la suspensión resultante cinco tubos de 22 × 200 mm, que contengan aproximadamente 15 mL del medio de cultivo inclinado o en una botella de Roux con 250 mL de medio de cultivo indicado en las <i>tablas 0100.4</i> y <i>0100.5</i>, con ayuda de perlas de vidrio estériles extender la suspensión en toda la superficie de la botella. Incubar durante el tiempo y la temperatura especificados en las mismas tablas, o hasta que el crecimiento sea evidente. Transcurrido el periodo de incubación, resuspender el crecimiento de cada tubo con aproximadamente 3 mL de solución salina estéril o con 50 mL cada botella de Roux el volumen depende de la cantidad de crecimiento (excepto en el caso de Bleomicina para el que debe usarse Medio 34; véase la <i>tabla 0100.4</i>).</p>		
<p><b>Método 2.</b> Preparación de esporas de <i>Bacillus subtilis</i>. Proceder como se indica en el método 1, inoculando 3 mL de la suspensión del microorganismo de prueba en una botella de Roux con 250 mL del medio de cultivo número 32. Incubar a la temperatura y tiempo indicados en la <i>tabla 0100.4</i> y <i>0100.5</i>. Recuperar el crecimiento con aproximadamente 50 mL de solución salina estéril, centrifugar y decantar el sobrenadante.</p>		



*“2026, Año de Margarita Maza Parada”*

Resuspender el sedimento con 50 a 70 mL de solución salina estéril y calentar la suspensión a 70 °C durante 30 min. Determinar la cantidad de inóculo que debe adicionarse a cada 100 mL de medio de cultivo para la capa siembra para obtener halos de inhibición bien definidos y de tamaño adecuado. Conservar la suspensión de esporas en refrigeración.		
<b>Método 3.</b> Preparación de inóculos de <i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 10541 para el método turbidimétrico. A partir de un cultivo reciente suspender en 3 mL de solución salina estéril, para facilitar la suspensión del microorganismo de prueba usar perlas de vidrio estériles. Los microorganismos se cultivan en medio líquido no en agar. Espesar la suspensión del organismo de prueba sobre la superficie de dos o más placas de agar o sobre la superficie de una botella de Roux que contenga 250 mL del medio indicado (véase <i>tabla 0100.5</i> ). Incubar durante el tiempo y a la temperatura especificada en la <i>tabla 0100.5</i> hasta que el crecimiento sea evidente.		
Después de incubar, recolectar el microorganismo de las placas o de la botella de Roux con aproximadamente 50 mL de solución salina estéril, usando una varilla de vidrio estéril doblada en ángulo recto o perlas de vidrio estériles. Con pipeta estéril transferir la suspensión a un frasco de vidrio estéril.		
A partir del crecimiento obtenido en las botellas de Roux, se retira el crecimiento con el diluyente indicado en la <i>tabla 0100.4</i> para valoración por		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

difusión en agar y en la <i>tabla 0100.5</i> para valoración por método turbidimétrico. La suspensión obtenida se denomina como suspensión madre.		
<i>Tabla 0100.4. Microorganismo de prueba para valoración cilindro – placa (Preparación del inoculo).</i>		
<b>[VÉASE TABLA AL FINAL]</b>		
<i>Tabla 0100.5. Microorganismo de prueba para valoración turbidimétrica.</i>		
<b>[VÉASE TABLA AL FINAL]</b>		
<b>Ajuste de la transmitancia del inoculo.</b>		
<b>Método por difusión en agar.</b> Tomar una parte de la suspensión madre y diluir considerando el factor de dilución especificado para cada antibiótico en la <i>tabla 0100.4</i> . El % de la transmitancia de la dilución debe ser $25 \pm 2\%$ . En caso de no cumplir este valor, ajustar la suspensión madre adicionando diluyente o concentrando la suspensión. Repetir la dilución y corroborar la transmitancia hasta obtener el valor deseado. Desechar la dilución preparada y conservar en refrigeración la suspensión madre. Tomar como guía la <i>figura 0100.1</i> .		
<i>Figura 0100.1. Ajuste de la suspensión madre.</i>		
<b>[VÉASE FIGURA AL FINAL]</b>		
A partir de la suspensión madre del microorganismo, considerar el volumen sugerido en la <i>tabla 0100.4</i> para preparar la capa siembra, este valor puede variar dependiendo de las condiciones de trabajo de cada laboratorio. Se sugiere realizar una prueba de inoculo con el objetivo de asegurar que las zonas de inhibición		



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

obtenidas a partir de la solución intermedia "C" se encuentren entre 14 mm-16 mm.		
<b>Prueba de inoculo para valoración por difusión en agar.</b>		
1. Preparar la capa base de 15 placas con el agar indicado de acuerdo al antibiótico por evaluar.		
2. A partir de la suspensión madre y considerando el volumen de inoculo sugerido por cada 100 mL descrito en la tabla 0100.4, seleccionar 5 porcentajes de concentración mayores y preparar las diluciones utilizando como diluyente el medio de cultivo indicado para la base siembra.		
3. Por cada porcentaje de inoculo preparado, extender el volumen de la capa siembra en tres placas que cuenten con la capa base (si lo requiere, según el antibiótico por probar). Al final se obtendrán 15 placas con la capa siembra preparada a diferente porcentaje de concentración.		
4. Mover cada placa de tal modo en el que se asegure que el medio inoculado cubre toda la superficie y dejar solidificar sobre una mesa plana y a nivel.		
5. Colocar 6 penicilindros de acero inoxidable estériles sobre cada placa a intervalos regulares de 60° en un radio de 2.8cm.		
6. Llenar los penicilindros de las 15 placas con la solución del estándar preparada a la concentración media (C), de acuerdo a lo indicado en la tabla 0100.6.		



"2026, Año de Margarita Maza Parada"

7. Incubar las placas de acuerdo a lo indicado en la tabla 0.100.7.		
8. Transcurrido el tiempo de incubación, tomar lectura de las zonas de inhibición obtenidas a partir de cada porcentaje de inoculo preparado.		
<b>Nota:</b> Las placas que presenten crecimiento de contaminantes, zonas de inhibición con una forma no definida o que las zonas de inhibición de crecimiento se junten con la zona del penicilindro continuo, deben descartarse.		
9. Promediar y seleccionar el porcentaje en donde se obtuvieron zonas de inhibición entre 14-16mm.		
10. Se pueden preparar la capa siembra de las placas utilizadas en los análisis independientes de la valoración de antibiótico considerando el porcentaje de inoculo seleccionado en esta prueba.		
11. Para no afectar la solidificación de la capa siembra, utilizar como valor máximo una concentración al 10% de inoculo en las placas preparadas.		
<i>Ejemplo:</i> En el caso de la determinación de ampicilina por el método de difusión en agar, se parte de la suspensión madre de <i>Kocuria rhizophila</i> , debe ajustarse a 25 % empleando una dilución 1:40.		
<b>Antibiótico</b>	<b>Condiciones de incubación</b>	



"2026, Año de Margarita Maza Parada"

	Microorganismo de prueba	Número ATCC <sup>a</sup>	Medio de cultivo	Temp. (°C)	Tiempo	Factor de dilución	Volumen de inóculo sugerido mL/100 mL	Duración en refrigeración (Sugerido)
Ampicilina	<i>Kocuria rhizophila</i> *	9341	1	32 - 35	24 h	1:40	0.5	2 semanas
El volumen sugerido para inocular 100 mL del medio de cultivo empleado como capa base es de 0.5 mL; por lo cual se debe establecer una serie de porcentajes con los que se asegure obtener halos de inhibición entre 14 – 16 mm.								
Si después de leer los halos de inhibición se presentan los resultados siguientes:								

Volumen inoculado (mL/100mL medio de cultivo)	% Inoculo	Halos de inhibición																		Promedio
		Placa 1						Placa 2						Placa 3						
1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6			
0.4	80%	19	19.1	18.3	17.8	19	18.7	19.2	19.5	18.4	18.7	17.3	17.6	19.1	18.8	18.3	18.6	19.1	18.6	18.617
0.5	100%	16.8	17.3	17	16.4	17.3	18.3	18.6	18	19.2	18.8	17.4	18.3	17.6	19.9	17.2	17.9	17.7	16	17.761
0.6	120%	14.3	15.3	14.9	15.4	16	15.8	15.2	14.9	16.3	15.5	16.3	15.2	15.4	15.7	16.3	14.8	15.4	15	15.428
0.7	140%	12.3	13.6	16.4	16.6	15.4	14.7	15.7	13.8	13.9	14.1	12.6	14.3	13.9	13	12.9	13.6	13.9	14.5	14.178
0.8	160%	8.8	9.3	10.8	9.6	10.3	11.1	11.4	12.4	12.1	11.8	12.6	9.8	10.4	11.8	10	9.9	10.4	10.5	10.722

Se establece 0.6 mL como volumen de inóculo por cada 100 mL de medio de cultivo, debido a que es con este inóculo que se obtienen halos de inhibición entre 14 y 16 mm de diámetro.		
---	--	--



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Se debe corroborar el volumen de suspensión de recolección que se utilizará como inóculo cada vez que se cambie lote del microorganismo utilizado.		
<b>GENERALIDADES DE LA VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA.</b>		
Las valoraciones microbiológicas dependen del tipo de microorganismo utilizado (variación biológica), naturaleza de la muestra y de la preparación de la sustancia de referencia (variación química); por lo cual, es necesario disminuir al mínimo las variaciones al llevar a cabo el método por difusión en agar o por el método turbidimétrico.		
La muestra se debe diluir para proporcionar una concentración nominal que se estima es equivalente a la concentración de la Sustancia de referencia en la solución de trabajo "c". El propósito de diluir la muestra a la concentración central de la Sustancia de referencia es asegurar que el resultado de ella caerá dentro de la porción lineal de la curva tipo.		
La prueba determina la potencia relativa de la muestra ("M") en función de la curva tipo, por lo tanto, la muestra "M" debe tener una potencia relativa de aproximadamente 100 %. Finalmente, la potencia de la muestra se obtiene multiplicando el resultado de la muestra por el factor de dilución en caso de aplicar.		
La primera valoración realizada debe considerarse preliminar si el valor de potencia de la muestra calculado es inferior al 80 % o superior a 125 %; en dicho caso los resultados sugieren que la concentración de la muestra supuesta durante la		



*“2026, Año de Margarita Maza Parada”*

preparación de la solución madre de la muestra es incorrecta; ya que la potencia se derivará de una porción de la curva tipo donde la respuesta de la Sustancia de referencia y de la muestra probablemente no es paralela. Si esto ocurre se puede ajustar la potencia supuesta de la muestra a la concentración media, basándose en el valor de potencia preliminar y repetir la valoración.		
Partiendo de soluciones madre y diluciones de prueba tanto de la sustancia de referencia como de la muestra preparadas por separado, llevar a cabo valoraciones adicionales de una muestra determinada. Para así determinar la concentración exacta de antibiótico que presenta la muestra de interés.		
<b>VALORACIÓN DE CILINDRO EN PLACA O MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR.</b>		
Las comparaciones se limitan a las relaciones entre las condiciones del diámetro de la zona de inhibición dentro de las placas, sin tener en cuenta la variación entre placas. Las respuestas individuales de las placas se corrigen basándose en el tamaño relativo de la zona de inhibición de la sustancia de referencia comparado con el tamaño medio de la zona de inhibición de la Sustancia de referencia ( $c_{36}$ ) en todas las placas (“a”, “b”, “d” y “e”). A continuación se describen los pasos a seguir para la preparación de un análisis independiente.		
<b>Preparación de las diluciones de la sustancia de referencia.</b> Preparar la solución madre considerando la pureza de la sustancia establecida en la etiqueta del producto; así como la		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

<p>concentración, diluyente inicial y vigencia de uso establecida en la <i>tabla 0100.6</i>. A partir de la solución madre y considerando la concentración media (<i>c</i>) indicada en la <i>tabla 0100.6</i>, preparar las cinco concentraciones de la curva; dos concentraciones inferiores (“<i>a</i>” y “<i>b</i>”) y dos concentraciones superiores (“<i>d</i>” y “<i>e</i>”). Entre cada dilución debe considerarse un factor de dilución de 1:1.25. En caso de ser necesario, es posible preparar una dilución intermedia entre la solución madre y las soluciones de trabajo (“<i>a</i>”, “<i>b</i>”, “<i>c</i>”, “<i>d</i>”, y “<i>e</i>”).</p>		
<p><b>Preparación de la muestra.</b> Para preparar la solución de prueba de la muestra, proceder de acuerdo a lo indicado en la monografía específica del producto. Considerar que la concentración de la solución de trabajo de la muestra debe ser igual a la concentración media (“<i>c</i>”) de la sustancia de referencia.</p>		
<p><b>Preparación de las placas.</b> Para la curva dosis respuesta utilizar un total de 12 placas, tres para cada concentración de las soluciones de trabajo de la sustancia de referencia (“<i>a</i>”, “<i>b</i>”, “<i>d</i>” y “<i>e</i>”). De acuerdo a lo indicado en la <i>tabla 0100.7</i>, seleccionar el medio de cultivo y colocar el volumen indicado para la capa base en las cajas petri. El medio debe cubrir toda la base de la caja y no tener burbujas. Preparar la capa siembra diluyendo la suspensión madre y el medio de cultivo especificado en la <i>tabla 0100.7</i>. El volumen del inoculo debe ser aquel que genere zonas de inhibición entre 14-16mm a partir de la solución “<i>c</i>”. Al adicionar la capa siembra en las placas que</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

contienen la capa base, asegurar que el medio se distribuya de manera homogénea y no se formen burbujas. Dejar solidificar y colocar seis penicilindros por placa, distribuidos a intervalos regulares de 60° en un radio de 2.8 cm.		
<b>Preparación de la curva tipo.</b> Llenar tres cilindros intercalados por placa con una de las soluciones de referencia (“a”, “b”, “d” o “e”) y tres penicilindros intercalados con la solución de concentración intermedia (“c”). Al final se deben tener tres placas por cada solución de trabajo (“a”, “b”, “d”, y “e”). De esta manera se obtienen 36 zonas de inhibición para la concentración de referencia (“c”) y nueve para las cuatro concentraciones restantes de la curva (“a, b, d y e”).		
<b>Análisis de la muestra.</b> Para cada muestra utilizar tres placas, llenar tres cilindros de cada placa con la concentración central de referencia (“c”) y en forma alterna llenar los otros tres con la muestra preparada a la concentración central o “c”. Incubar las placas durante 16 a 18 h (o el tiempo necesario, según el microorganismo utilizado) a la temperatura indicada para cada antibiótico en la tabla 0100.4. Concluido el periodo de incubación medir el diámetro de las zonas de inhibición. En la figura 0100.2 se observan placas que no cumplen con la apariencia de un inoculo homogéneo, sin contaminación, medio de cultivo homogéneo, etc.		
<b>Figura 0100.2.</b> Ejemplo. a) y b) placas con inoculo sin crecimiento homogéneo ni zonas de inhibición definidas; c) y d) Crecimiento de contaminantes dentro de la zona de inhibición; e) contaminación y presencia de burbujas sobre la capa siembra; f)		



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

zonas de inhibición que se unen entre ellas y g) placa que cumple con los requisitos necesarios para considerar lecturas válidas.		
[VÉASE FIGURA AL FINAL]		
<b>Análisis independientes.</b> Cada análisis independiente de muestra incluye la preparación de una curva tipo y la muestra. Realizar al menos tres análisis independientes para la valoración microbiológica de un antibiótico. Durante la verificación del método en el laboratorio		
Tabla 0100.6. Preparación de la solución madre y diluciones de prueba de la Sustancia de referencia (método cilindro-placa).		
[VÉASE TABLA AL FINAL]		
Tabla 0100.7. Capa base, capa siembra y condiciones de incubación de la prueba.		
[VÉASE TABLA AL FINAL]		
<b>MÉTODO TURBIDIMÉTRICO</b>		
Para este método, es imprescindible contar con celdas y un equipo que disminuya la variación al momento de tomar las lecturas de Absorbancia o transmitancia. El espectrofotómetro se puede modificar de la siguiente manera:		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Para que acepte el tubo en el que se lleva a cabo la incubación.</li> </ul>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Para que acepte una celda modificada equipada con un drenaje que facilite el cambio rápido del contenido.</li> </ul>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Para que contenga una celda de flujo para un análisis de flujo continuo.</li> </ul>		
<b>Material</b>		



*“2026, Año de Margarita Maza Parada”*

Usar tubos de ensaye de vidrio o plástico estériles de 16 mm x 125 mm o de 18 mm x 150 mm, o tubos que tengan una longitud, diámetro y espesor relativamente uniformes y que no presenten rayaduras o defectos en la superficie. Los tubos empleados en el espectrómetro tubos con las mismas características. Limpiar la parte externa de los tubos de forma minuciosa para eliminar cualquier tipo de residuo durante la lectura en el espectrofotómetro.		
<b>Ajuste de la suspensión empleada como inóculo</b>		
Partiendo de la suspensión Madre obtenida con los microorganismos mencionados en la tabla 0100.5 se debe realizar un ajuste en la transmitancia de tal forma que los tubos que contengan la dosis media de la solución de referencia tengan una absorbancia de al menos 0.3 unidades de absorbancia (50% de transmitancia), excepto la amikacina, clortetraciclina, gramicidina y tetraciclina que deben tener 0.35 unidades de absorbancia (45% de transmitancia) y la tobramicina debe tener 0.4 unidades de absorbancia (40% de transmitancia).		
Para la preparación de inoculo utilizando una cepa de <i>K. pneumoniae</i> , usar cepas no capsuladas y cultivar en medio líquido.		
Se sugiere realizar una prueba de inoculo antes de iniciar las valoraciones independientes con el objetivo de estandarizar la concentración del inoculo a utilizar y obtener zonas de inhibición entre 14mm y 16mm al probar la concentración media o central “c” de la sustancia de referencia.		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

<p><b>Nota:</b> La prueba de inoculo también puede probarse antes de cumplir la caducidad de la suspensión madre establecida en la <i>tabla 0100.4</i>.</p>		
<p><b>Preparación de las diluciones de la sustancia de referencia.</b> Preparar la solución madre considerando la pureza de la sustancia establecida en la etiqueta del producto; así como la concentración, diluyente inicial y vigencia de uso establecida en la <i>tabla 0100.8</i>.</p>		
<p>Considerando la concentración media o central (“c”) indicada en la misma tabla y utilizando el factor de dilución 1:1.25, preparar las cinco concentraciones de la curva, dos por debajo (“a”), (“b”) y dos por arriba (“d”), (“e”) de la concentración media.</p>		
<p><b>Nota:</b> Puede ser necesario usar relaciones más pequeñas para diluciones sucesivas de la solución madre para la valoración turbidimétrica, considerar que en el intervalo de trabajo se debe demostrar un comportamiento lineal.</p>		
<p><b>Preparación de la muestra.</b> Asignar una potencia por unidad de peso o volumen a la muestra desconocida, el día de la valoración preparar una solución madre y posteriormente una solución de trabajo a la concentración intermedia de acuerdo a lo especificado en la <i>tabla 0100.8</i> o de acuerdo a lo especificado en la monografía del producto.</p>		
<p><b>Procedimiento para la prueba.</b> Para cada antibiótico enlistado en la <i>tabla 0100.5</i>, seleccionar el microorganismo de prueba, medio de cultivo, volumen de inóculo sugerido para cada 100 mL de medio de cultivo. Realizar la preparación del</p>		



*“2026, Año de Margarita Maza Parada”*

inoculo de acuerdo a lo establecido en el presente método.		
Para la curva dosis respuesta usar 15 tubos (cinco series de tres tubos cada una) y para la muestra usar tres tubos.		
A cada serie de tres tubos adicionar 1.0 mL (o 0.1 mL en el caso de la gramicidina) de cada concentración de la curva dosis respuesta (“a”, “b”, “c”, “d” y “e”) de la solución de referencia; en el caso de la muestra, adicionar a cada uno de los tres tubos 1.0 mL de la solución de trabajo preparada a la concentración media o central (“c”). Incluir de manera similar en cada gradilla uno o dos tubos control que contengan 1 mL del diluyente de prueba, pero no antibiótico, colocar los tubos de manera aleatoria dentro de la gradilla.		
Adicionar a cada serie de tres tubos (curva dosis respuesta, muestra y control) 9.0 mL del medio de cultivo inoculado y colocar de inmediato en baño de agua con agitación continua a la temperatura indicada en la <i>tabla 0100.9</i> .		
<i>Figura 0100.3. Preparación de tubos para análisis por método turbidimétrico.</i>		
[VÉASE FIGURA AL FINAL]		
El tiempo de incubación se detiene cuando en los tubos que contienen la concentración central (“c”) de la Sustancia de referencia se observa una turbiedad cercana al 50 por ciento de transmitancia o 0.3 absorbancia (de 2 a 5 h), o lo establecido en la <i>tabla 0100.10</i>		
Retirar los tubos del baño y adicionar inmediatamente a cada uno 0.5 mL de una solución de formaldehído 1:3. Llevar la gradilla a		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

temperatura ambiente. Ajustar el espectrofotómetro a 100 por ciento de transmitancia con el control negativo que contiene medio de cultivo sin inocular y 0.5 mL de solución de formaldehído a la concentración indicada. Leer la transmitancia de cada tubo a una longitud de onda de 530 a 580 nm y promediar los valores obtenidos. Analizar una gradilla cada vez.		
Tabla 0100.8. Preparación de la solución madre y diluciones de prueba de la Sustancia de referencia (método turbidimétrico).		
[VÉASE TABLA AL FINAL]		
Tabla 0100.9. Incubación de la prueba.		
[VÉASE TABLA AL FINAL]		
Tabla 0100.10. Valores de transmitancia para detener el crecimiento.		
[VÉASE TABLA AL FINAL]		
<b>CÁLCULOS</b>		
Para calcular la actividad se utiliza el diseño incompleto desbalanceado 5+1 en bloques, basado en la interpolación de una recta patrón obtenido por transformación logarítmica y ajustada por cuadrados mínimos. A continuación se ejemplifica el cálculo de potencia usando resultados de la valoración que se muestran en la tabla 0100.11 y la tabla 0100.12.		
Tabla 0100.11. Ejemplificación de valoración Cilindro – Placa. Curva tipo de la Sustancia de Referencia y resultados de una muestra.		
[VÉASE TABLA AL FINAL]		
Tabla 0100.12. Ejemplificación de valoración turbidimétrica. Curva tipo de la Sustancia de Referencia y resultados de una muestra.		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

[VÉASE TABLA AL FINAL]		
<b>Paso 1.</b>		
Determinar el promedio, desviación estándar y desviación estándar relativa de los resultados obtenidos por ambos métodos.		
<b>Difusión en agar.</b> Calcular el promedio de los 9 valores obtenidos por cada dilución de trabajo de la sustancia de referencia y de la solución de trabajo de la muestra. Determinar el promedio, desviación estándar y Desviación estándar relativa. Calcular el promedio de los 36 valores obtenidos a partir de la solución de trabajo “c” y calcular promedio, desviación estándar y desviación estándar relativa.		
Por ejemplo, para la solución de trabajo “a”:		

$$\bar{x}_a = \frac{(12.6 + 13.0 + 12.8 + 13.0 + 12.8 + 12.6 + 12.0 + 13.8 + 12.8)}{9}$$

$$\bar{x}_a = 12.82$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{A^2 + B^2 + C^2 + D^2 + E^2 + F^2 + G^2 + H^2 + I^2}{n - 1}}$$

$$\sigma = 0.47$$

A= (12.6-12.82)		
B= (13.0-12.82)		
C= (12.8-12.82)		
D= (13.0-12.82)		
E= (12.8-12.82)		
F= (12.6-12.82)		
G= (12.0-12.82)		
H= (13.8-12.82)		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

I = (12.8-12.82)		
<b>Método turbidimétrico.</b> Con los datos obtenidos en unidades de absorbancia o transmitancia, calcular el promedio, desviación estándar y desviación estándar relativa.		
$\bar{x}_a = \frac{(30.989 + 31.679 + 31.789)}{3}$		
$\bar{x}_a = 31.486$		
$\sigma = \sqrt{\frac{A^2 + B^2 + C^2}{\sqrt{n - 1}}}$		
$\sigma = \sqrt{\frac{0.247 + 0.037 + 0.092}{2}}$		
$\sigma = 0.434$		
A= (30.989-31.486)		
B= (31.679-31.486)		
C= (31.789-31.486)		
<b>Paso 2.</b>		
Para establecer el criterio de la aptitud de variabilidad, cada laboratorio debe determinar un valor máximo de desviación estándar relativa (DSR) (el límite sugerido es $\leq 10\%$ ) para el método de difusión en agar o $\leq 10\%$ del promedio de la transmitancia obtenida a través de las cinco concentraciones probadas.		
<b>Método de difusión en agar.</b> Comparar los valores de DSR obtenidos en las zonas obtenidas para “a”, “b”, “d”, “e”, “ca”, “cb”, “cd” y “ce”; de los cuales, ninguno debe sobrepasar el criterio de aceptación para la aptitud de variabilidad.		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Tabla 0100.13. Resultados de la Desviación estándar de las soluciones de trabajo preparadas a partir de la sustancia de referencia. Método difusión en agar.		
[VÉASE TABLA AL FINAL]		
Para calcular la DSR de las zonas de inhibición generadas por la solución de trabajo “a” de la sustancia de referencia, realizar lo siguiente:		
$DSR = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$		
$DSRa = \frac{0.47}{12.82} \times 100 = 3.7\%$		
Los ocho valores de la DSR obtenidos, deben ser menores al criterio de aptitud de variabilidad establecido por el laboratorio.		
<b>Método turbidimétrico.</b> Calcular la DSR de cada dilución de la sustancia de referencia y de la muestra probada para obtener el valor de carácter informativo. Por ejemplo, para calcular la DSR de la solución de trabajo “a” de la sustancia de referencia se realiza lo siguiente:		
$DSR = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$		
$DSRa = \frac{0.434}{31.486} \times 100 = 1.38\%$		
Calcular el valor combinado de la desviación estándar obtenida en todas las soluciones de trabajo de la sustancia de referencia:		
$\sigma_{combinada} = \sqrt{\frac{\sigma_a^2 + \sigma_b^2 + \sigma_c^2 + \sigma_d^2 + \sigma_e^2}{5}}$		



"2026, Año de Margarita Maza Parada"

$\sigma_{\text{combinada}} = \sqrt{\frac{0.434^2 + 2.698^2 + 1.144^2 + 1.210^2 + 1.087^2}{5}}$		
$\sigma_{\text{combinada}} = 1.5115$ En este ejemplo, el valor máximo para la desviación estándar combinada es no más de 10% del valor de transmitancia promedio a través de las cinco concentraciones.		
$\bar{X}_{\text{Transmitancia}} = \frac{31.486 + 43.371 + 52.576 + 62.380 + 70.645}{5}$		
$\bar{X}_{\text{Transmitancia}} = 52.082\%$		
El 10% del $\bar{X}_{\text{Transmitancia}}$ es 5.208.		
El valor de la desviación estándar combinada $1.5115 < 5.208$ .		
Si el número de determinaciones repetidas por concentración es al menos 5, se puede calcular el coeficiente de variación para cada concentración, después verificar los valores atípicos de acuerdo a lo establecido en el <i>Capítulo de Estadística para ensayos biológicos</i> y comparar con un coeficiente de variación máximo aceptable. El límite sugerido para el coeficiente de variación es no más de 10%.		
<b>Paso 3 (Solo para método de difusión en agar).</b>		
Realizar una corrección de variación de los valores de las zonas de inhibición de la curva tipo de la sustancia de referencia. La corrección es aplicada para convertir la medición de zona promedio obtenida para cada concentración al valor que se		



"2026, Año de Margarita Maza Parada"

obtendría si la medición de la concentración de referencia promedio para dicho conjunto de tres placas repetidas fuera la misma que el valor del punto de corrección ( $c_{36}$ ).		
$[Dil.SRef_{corregida}] (a,b,d,e) = \bar{X}_{a,b,d,e} - (\bar{X}_{C_{a,b,d,e}} - c_{36})$		
<p>Donde:</p> <p><math>[Dil. SRef_{corregida}]</math>= Valor de la dilución de la solución de referencia corregida (a, b, d, e).</p> <p><math>\bar{X}_{a,b,d,e}</math>=Media original de a,b,d,e.</p> <p><math>\bar{X}_{C_{a,b,d,e}}</math>= Media de la concentración c en cada una de las diluciones (<math>c_a, c_b, c_d, c_e</math>)</p> <p><math>c_{36}</math> = Promedio de los 36 valores obtenidos de c en la valoración.</p>		
<p><b>Corrección de las zonas de inhibición de la Sustancia de referencia (mm)</b></p> <p>a = 12.82 - (14.44 - 14.56) = 12.94      b = 13.69 - (14.53 - 14.56) = 13.71      d = 15.29 - (14.80 - 14.56) = 15.04      e = 15.87 - (14.44 - 14.56) = 15.99      M = 14.44 - (14.53 - 14.56) = 14.47</p>		
<p><b>Paso 4.</b></p>		
<p>Determinar la línea recta de la curva tipo.</p>		
<p><b>Método de difusión en agar.</b> Generar la línea de la curva tipo graficando las mediciones corregidas de la zona de inhibición en función del logaritmo de los valores de la concentración de la Sustancia de referencia. Usando un software apropiado o las indicaciones del capítulo de <i>Estadística para ensayos biológicos</i>, determinar la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (<math>r^2</math>); donde</p>		



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

el eje de las abscisas (x) corresponde al logaritmo de la concentración de las diluciones de la sustancia de referencia (a, b, c, d, e) y el eje de las ordenadas (y) la zona de inhibición.		
<i>Tabla 0100.14. Valores para obtener la línea de la recta por el método de difusión en agar.</i>		
<b>[VÉASE TABLA AL FINAL]</b>		
Usar el logaritmo natural o el logaritmo en base 10 para graficar la curva tipo y determinar la ecuación de regresión; ambos proporcionan el mismo resultado de prueba final.		
Cada laboratorio debe determinar un valor mínimo del coeficiente de determinación (% $r^2$ ) para una regresión aceptable, esto ocurre solo si el % $r^2$ obtenido excede el valor predeterminado. [El límite sugerido para el coeficiente porcentual de determinación es no menos de 95 %].		
<i>Figura 0100.4. Gráfica de curva tipo, valoración cilindro-placa.</i>		
<b>[VÉASE FIGURA AL FINAL]</b>		
Utilizando la fórmula de ecuación de la recta, determinar el punto de intersección con "y" (Medición de zona corregida) y la ordenada al origen.		
$y = mx + b$ , despejando la ecuación tenemos:		
$x = \frac{y-b}{m}$		
$r^2 = 0.9927$		
$m = 7.761$ (pendiente)		
$b = 14.44$ (ordenada al origen)		
<b>Método turbidimétrico.</b> Generar la línea de la curva tipo, graficando los valores de transmitancia promedio en función del logaritmo de los valores		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

de concentración de la Sustancia de referencia (a, b, c, d y e). Calcular la ecuación de la línea de la curva tipo, realizando una regresión lineal no ponderada sobre estos valores usando software apropiado o las indicaciones del capítulo de “Estadística para ensayos biológicos”.		
<b>Nota:</b> usar el logaritmo natural o el logaritmo en base 10 para graficar la curva tipo y determinar la ecuación de regresión; ambos proporcionan el mismo resultado de prueba final. Se debe determinar un valor mínimo del coeficiente de determinación (% $r^2$ ) para una regresión aceptable. La regresión es aceptable únicamente si el valor % $r^2$ obtenido excede este valor predeterminado.		
<b>Nota:</b> el límite sugerido para el coeficiente porcentual de determinación es no menos de 90%.		
La <i>tabla 0100.15</i> resume la porción de la <i>tabla 0100.12</i> requerida para esta parte del cálculo.		
<i>Tabla 0100.15.</i> Valores para obtener la línea de la recta por el método turbidimétrico.		
[VÉASE TABLA AL FINAL]		
<b>Resultados de la regresión lineal</b> Línea de la curva tipo de la Sustancia de referencia		
$y = mx + b$ , despejando la ecuación tenemos: $x = \frac{y-b}{m}$		
$r^2 = 0.996$		
$m = 43.682$ (pendiente)		
$b = 52.106$ (ordenada al origen)		
<i>Figura 0100.5.</i> Gráfica de curva tipo, valoración turbidimétrica.		
[VÉASE FIGURA AL FINAL]		
<b>Paso 5.</b>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Determinación de la potencia de la muestra. Para estimar la potencia de la muestra, utilizar la ecuación de la recta para determinar el punto de intersección.		
<b>Método de difusión en agar.</b> Para determinar la potencia de la muestra desconocida, promediar las mediciones de la zona de la sustancia de referencia y las mediciones de la zona de la muestra en las tres placas usadas. Corregir por variación entre placas, usando el punto de corrección determinado anteriormente ( $C_{36}$ ) para obtener un promedio corregido para la muestra desconocida “M”.		
<b>Nota:</b> un método alternativo aceptable al uso del punto de corrección consiste en corregir usando el valor en la línea de regresión estimada correspondiente al logaritmo de la concentración de “c”.		
Usar la medición de zona promedio corregida en la ecuación de la línea de la curva tipo para determinar el logaritmo de la concentración de la muestra, $\log(x)$ , mediante:		
$\log(x) = \frac{y - b}{m}$		
Donde:		
$x$ = Logaritmo de la concentración de la muestra.		
$y$ = muestra desconocida.		
$b$ = ordenada al origen.		
$m$ = pendiente de la recta.		
$\log(x) = \frac{y - 14.44}{7.761}$		
$\log(x) = \frac{14.47 - 14.44}{7.761} = 0.0039$		



"2026, Año de Margarita Maza Parada"

Calcular el antilogaritmo de la muestra y el % de la potencia:		
Antilog(0.0039): $1.009 \times 100 = 100.9\%$		
De manera alternativa, se puede calcular la potencia de la muestra determinando el contraste lineal del patrón ( $L_p$ ) según lo indicado en el capítulo de <i>Estadística para ensayos biológicos</i> .		
<b>Método de turbidez.</b> Para estimar la potencia de la muestra desconocida, promediar las tres mediciones de transmitancia para obtener un promedio para la muestra desconocida "M". Usar esta medición promedio en la ecuación de la línea de la curva tipo para determinar el logaritmo natural de la concentración de la muestra desconocida, $L_M$ mediante:		
$\log(x) = \frac{y - b}{m}$		
Donde:		
$x$ = logaritmo de la concentración de la muestra.		
$y$ = muestra desconocida.		
$b$ = ordenada al origen (52.128).		
$m$ = pendiente de la recta (43.787).		
$\log(x) = \frac{y - 52.106}{43.682}$		
$\log(x) = \frac{50.608 - 52.106}{43.682} = -0.034$		
Calcular el antilogaritmo de la muestra y el % de la potencia:		
Antilog (-0.034): $0.966 * 100 = 96.60\%$ .		
<b>LÍMITES DE CONFIANZA Y COMBINACIÓN DE LOS CÁLCULOS DE LAS VALORACIONES POR</b>		



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

<b>MÉTODO DE DIFUSIÓN EN PLACA Y MÉTODO TURBIDIMÉTRICO.</b>		
Debido a la variabilidad de la potencia de la muestra para cada determinación independiente, comenzar con soluciones madre y diluciones de prueba tanto de la Sustancia de referencia como de la muestra, preparadas por separado.		
Una vez realizados al menos tres análisis independientes, verificar la presencia de valores atípicos, utilizando el procedimiento indicado en el capítulo de <i>"Estadística para ensayos biológicos"</i> . En caso de detectar valores atípicos o aberrantes, estos se deben excluir del cálculo final de la potencia. No se puede excluir más de una potencia como medición atípica.		
Para obtener una estimación combinada de la potencia desconocida, calcular el promedio, ( $M$ ) y la desviación estándar de los logaritmos de las potencias aceptadas (excluir los valores aberrantes).		
<b>Nota:</b> usar el logaritmo natural o el logaritmo en base 10.		
Determinar el intervalo de confianza para la potencia, según se indica a continuación:		
$\text{Antilog} [M - t (0.05, N - 1) \times \sigma / \sqrt{N}]$ ,		
$\text{Antilog} [M + t (0.05, N - 1) \times \sigma / \sqrt{N}]$		
Dónde: $M$ = Promedio del Log de las potencias obtenidas en las valoraciones independientes. $\sigma$ = Desviación estándar. $N$ = Número de valoraciones.		



"2026, Año de Margarita Maza Parada"

<p><math>t(0.05, N-1)</math> el punto del 5% de dos colas de una distribución <math>t</math> de Student con <math>N-1</math> grados de libertad.</p> <p><b>Nota:</b> el valor <math>t</math> está disponible en hojas de cálculo, textos estadísticos y software estadístico.</p> <p>Ejemplo. Considerando los resultados, calcular los límites de confianza por ambos métodos microbiológicos:</p>		
---	--	--

### ***Método de difusión en agar***

Primer análisis independiente: 100.5%

Segundo análisis independiente: 103.8%

Tercer análisis independiente: 98.10%

### ***Método turbidimétrico***

Primer análisis independiente: 105.6%

Segundo análisis independiente: 99.1%

Tercer análisis independiente: 103.4%

Ln de cada valoración y cálculo de promedio y desviación estándar

Ln: 4.61, 4.64 y 4.59.

X=4.613, σ= 0.025

Ln: 4.66, 4.60 y 4.64.

X=4.633, σ= 0.031

### **Calculando los límites de confianza**

$$\text{Antilog} \left[ M - t(0.05, N-1) \times \frac{\sigma}{\sqrt{N}} \right] . \text{Antilog} \left[ M + t(0.05, N-1) \times \frac{\sigma}{\sqrt{N}} \right]$$

Antilog[4.613 -(4.30 \*(0.025/√3)),  
Antilog[4.613-(0.060)]  
Antilog[4.553]= 94.92%.

Antilog[4.633 -(4.30 \*(0.031/√3)),  
Antilog[4.633-(0.077)]  
Antilog[4.556]= 95.20%.

Antilog[4.613 +(4.30 \*(0.025/√3)),  
Antilog[4.613+(0.060)]  
Antilog[4.673]= 107.02%.  
**94.92%-107.02%**

Antilog[4.633 +(4.30 \*(0.031/√3)),  
Antilog[4.633+(0.077)]  
Antilog[4.710]= 111.05%.  
**95.20%-111.05%**



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Determinar la mitad de la amplitud del intervalo de confianza partiendo de la siguiente fórmula:		
w: $\text{Antilog} \left[ t(0.05, N - 1) x \frac{\sigma}{\sqrt{N}} \right]$		
Dónde: w = Mitad de la amplitud del intervalo de confianza.		
Comparar la mitad de la amplitud del intervalo de confianza con un valor máximo predeterminado aceptable establecido por el laboratorio. Si la relación de la mitad de la amplitud entre el promedio de logaritmo del promedio de las valoraciones es mayor que el límite de aceptación, continuar con análisis adicionales.		
Ejemplo: suponer que la muestra se valora cuatro veces, con resultados de potencia en la escala logarítmica natural de 4.61, 4.64, 4.59 y 4.60, entonces:		
N=4		
$t(0.05, N-1)=3.182$		
$\sigma= 0.022$		
$\sqrt{N}=2$		
$\bar{x}=4.61$		
El intervalo de confianza en la escala logarítmica es:		
$4.61 \pm \left( 3.182 \times \frac{0.022}{2} \right)$ $= 4.61 \pm 0.035$		
Límite inferior: 4.575, Límite superior: 4.645		
w=0.035		
Límite superior= 4.645		



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Determinar la relación entre el límite de confianza superior y la potencia promedio estimada:		
$w = \frac{\text{Antilog Límite de confianza superior}}{\text{Antilog Potencia estimada}}$		
$\frac{4.645}{4.61} = 1.008$		
La relación entre el límite de confianza superior y la potencia promedio estimada debe ser menor al valor aceptable establecido por el laboratorio y corroborarlo durante la verificación del método.		
<b>CRITERIOS DE VALIDEZ</b>		
1. En el método por difusión en placa (véase figura 0100.2):		
a. Las zonas de inhibición de la curva dosis y de la muestra deben ser definidas ser consideradas medibles.		
b. No se debe observar crecimiento de contaminantes en las zonas de inhibición.		
<b>Nota:</b> En caso de utilizar microorganismos que presenten crecimiento grumoso inmerso en el agar (como <i>Mycobacterium smegmatis</i> y <i>B. subtilis</i> ), considerar que dentro de las zonas de inhibición		



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

puede haber restos del microorganismo sin crecimiento aparente.		
c. Las zonas de inhibición generadas por cada penicilindro no se deben unir.		
d. El promedio de las zonas de inhibición generadas en la curva dosis respuesta por la solución intermedia o central "c" ( $C_{36}$ ) se debe encontrar entre 14-16mm. Valores mayores o menores contribuyen a una mayor variabilidad en los resultados por su naturaleza biológica.		
2. Para el método turbidimétrico:		
a. El tubo control colocado en cada gradilla debe reflejar la ausencia de inhibición de crecimiento (menor %Transmitancia). Compararlo con la lectura del tubo al que le fue adicionado la solución de trabajo de la sustancia de referencia en concentración "a".		
3. Los resultados se consideran válidos únicamente si la potencia calculada se encuentra entre 80%-125% de la potencia asumida al preparar la solución madre de la muestra.		



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

4. El coeficiente de determinación $r^2$ de la curva preparada con la sustancia de referencia debe ser $\geq 0.95$ o $\geq 95\%$ .		
5. Se requieren tres o más valoraciones independientes para determinaciones de la potencia de antibióticos.		
6. En caso de obtener un valor aberrante, descartar la potencia obtenida y realizar análisis independientes adicionales. No excluir más de una potencia como medición atípica.		
7. Para obtener una estimación combinada de la potencia desconocida, calcular los límites de confianza.		
8. Determinar el valor para la mitad de la amplitud del intervalo de confianza. La relación entre el log (natural o base 10) del límite de confianza superior entre el log del promedio de las potencias obtenidas debe ser menor al criterio de aceptación establecido por el laboratorio.		
<b>CONSIDERACIONES GENERALES</b> Deben ser considerados dos conceptos esenciales al interpretar los resultados de potencia del antibiótico.		
1. La manera más efectiva para reducir la variabilidad del valor de informe (media geométrica de la potencia de todos los		



*“2026, Año de Margarita Maza Parada”*

<p>ensayos y duplicados) son los ensayos independientes del proceso de valoración. Una serie de valoraciones independientes pequeñas realizadas a lo largo de varios días generan resultados que al ser combinados son una estimación de potencia más confiables que la obtenida de una sola valoración grande con la misma cantidad de placas. Son necesarias tres o más valoraciones independientes para la determinación de potencia de antibióticos.</p>		
2. El número de valoraciones requeridas para obtener una estimación confiable de potencia de antibióticos depende del intervalo de especificación requerido y la variabilidad de la valoración.		
Los diseños experimentales adecuados son clave para aumentar la precisión y minimizar el sesgo. Controlar los parámetros de incubación, (es crítica la homogeneidad de la temperatura dentro de la cámara de incubación y el tiempo de incubación), esto se puede lograr acomodando las placas y las gradillas según se indica en el patrón de calificación del equipo y respetando el intervalo de temperatura para cada valoración, para minimizar el sesgo.		
Las relaciones biológicas de dosis-respuesta por lo general no son lineales. El diseño incompleto desbalanceado 5+1 en bloques permite ajustar los datos a una línea recta, evaluando un intervalo de		



*“2026, Año de Margarita Maza Parada”*

<p>concentración estrecho en el que los resultados se acercan a la linealidad. Los resultados de la valoración se consideran válidos únicamente si la potencia calculada es de 80 a 125 % de la potencia asumida al preparar la solución madre de la muestra. Cuando la potencia calculada se encuentra fuera de dicho intervalo se debe ajustar la potencia asumida de la muestra según corresponda y repetir la valoración para obtener un resultado válido.</p>		
<p>Las determinaciones microbiológicas de potencia están sujetas a variables intervaloración e intravaloración, de modo tal que se requieren tres o más valoraciones independientes para obtener una estimación confiable de la potencia de una muestra determinada.</p>		
<p>La potencia media debe incluir los resultados de todas las valoraciones independientes válidas (se excluyen aquéllas identificadas como valores atípicos o aberrantes). El número de valoraciones requerido para lograr una estimación de potencia confiable depende de la variabilidad de la valoración y de la incertidumbre máxima requerida para la estimación de potencia. Esta última se evalúa mediante la amplitud del intervalo de confianza.</p>		
<p>El resultado combinado de una serie de valoraciones independientes más pequeñas a lo largo de varios días es una estimación de potencia más confiable que la obtenida de una sola valoración grande con el mismo número total de placas o tubos. Se debe tomar en cuenta que las valoraciones adicionales o una menor variabilidad</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

permiten que el producto cumpla con intervalos de especificación más estrechos. Al reducir la variabilidad de las valoraciones se logra el límite de confianza requerido con menos valoraciones.

*Tabla 0100.1. Antibióticos que requieren valoración microbiológica.*

<b>Antibiótico</b>	<b>Tipo de valoración</b>
Ampicilina	Cilindro - placa
Amikacina	Turbidimétrico
Amfotericina B	Cilindro - placa
Bacitracina	Cilindro - placa
Bleomicina	Cilindro - placa
Carbenicilina	Cilindro - placa
Cefalotina	Cilindro - placa
Cloranfenicol	Turbidimétrico
Colistina	Cilindro - placa
Doxiciclina	Turbidimétrico
Eritromicina	Cilindro - placa
Estreptomicina	Turbidimétrico
Gentamicina	Cilindro - placa
Gramicidina	Turbidimétrica
Kanamicina	Turbidimétrico
Natamicina	Cilindro - placa
Netilmicina	Cilindro - placa
Neomicina	Cilindro - placa
	Turbidimétrico



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Nistatina	Cilindro - placa
Oxitetraciclina	Turbidimétrico
Paromomicina	Cilindro - placa
Penicilina G	Cilindro - placa
Polimixina B	Cilindro - placa
Rifampicina	Cilindro - placa
Tetraciclina	Turbidimétrico
Tobramicina	Turbidimétrico
Vancomicina	Cilindro - placa

*Tabla 0100.2. Medios de cultivo.*

Ingredientes gramos por litro	Número																	
	1	2	3	4	5	8	9	10	11	13	19*	32	34	35	36	39	40	41
Peptona <sup>(1)</sup>	6	6	5	6	6	6		6	10	9.4	6	10	10	15	5			
Peptona de caseína	4	-	-	-	-	-	17	17	4	-	-	4	-	-	-	-	9	
Peptona de soya	-	-	-	-	-	-	3	3	-	-	-	-	-	5	-	-	-	
Polipeptona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	
Extracto de levadura	3	3	1.5	3	3	3	-	-	3	-	4.7	3	-	-	1.5	20	5	
Extracto de carne	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	-	-	1.5	-	2.4	1.5	10	10	-	1.5	-	-
Dextrosa	1	-	1	1	-	-	2.5	2.5	1	20	10	1	-	-	1	10	20	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	3.68	-	-	2.5	2.5	-	-	-	-	-	-	-	3.68	-	1	



*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	-	-	1.32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.32	2	1
Cloruro de sodio	-	-	3.5	-	-	-	5	5	-	-	10	-	3	3	5	3.5	-	-	-	-
Polisorbato 80 <sup>(2)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-	-
Glicerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	10	-	-	-	-	-	-
Agar	15	15	-	15	15	15	20	12	15	-	23.5	15	-	17	15	-	10	-	-	-
Sulfato de manganeso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato de sodio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-
pH después de esterilizar	6.6	6.6	7.0	6.6	7.9	5.9	7.2	7.2	8.3	5.6	6.1	6.6	7.0	7.0	7.3	7.9	6.7	6.8		
	$\pm 0.1$	$\pm 0.1$	$\pm 0.05$	$\pm 0.1$	$\pm 0.2$	$\pm 0.1$														

(1) Utilizar peptona de carne o caseína.

(2) Agregar después de hervir el medio de cultivo.

\* Equivalente al medio de cultivo Antibiótico núm. 12.

*Tabla 0100.3. Soluciones amortiguadoras.*

Ingredientes gramos por litro de agua	Número					
	1	3	4	6	10	16
Concentración	1 %	0.1 M	0.1 M	10 %	0.2 M	0.1 M
pH	$6.0 \pm 0.05$	$8.0 \pm 0.1$	$4.5 \pm 0.05$	$6.0 \pm 0.05$	$10.5 \pm 0.1$	$7.0 \pm 0.2$
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	2.0	16.73	-	20.0	35.0	13.6
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	8.0	0.523	13.61	80.0	-	4.0
KOH 10 N	-	-	-	-	2.0 (mL)	-



"2026, Año de Margarita Maza Parada"

*Tabla 0100.4. Microorganismo de prueba para valoración cilindro – placa (Preparación del inóculo).*

Antibiótico	Microorganismo de prueba	Número ATCC <sup>a</sup>	Condiciones de incubación			Factor de dilución	Volumen de inóculo sugerido mL/100 mL	Duración en refrigeración (Sugerido)
			Medio de cultivo	Temp. (°C)	Tiempo			
Ampicilina	<i>Kocuria rhizophila</i> *	9341	1	32 - 35	24 h	1:40	0.5	2 semanas
Amfotericina B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9763	19	29 - 31	48 h	1:30	1.0	4 semanas
Bacitracina	<i>Kocuria rhizophila</i> * o <i>Micrococcus luteus</i>	9341 o 10240	1	32 - 35	24 h	1:35	0.3	2 semanas
Bleomicina	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	607	36	36 - 37.5	48 h	1:13	1.0	2 semanas
Carbenicilina	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25619	1	36 - 37.5	24 h	1:25	0.5	2 semanas
Cefalotina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	1	32 - 35	24 h	1:25	0.1	Determinar
Cloxacilina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	1	32 - 35	24 h	1:20	0.1	1 semana
Colistina	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617	1	32 - 35	24 h	1:20	0.1	2 semanas
Eritromicina	<i>Kocuria rhizophila</i> *	9341	1	32 - 35	24 h	1:40	1.5	2 semanas
Gentamicina	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	1	32 - 35	24 h	1:24	0.03	1 semana
Neomicina	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	1	32 - 35	24 h	1:24	0.4	1 semana
Netilmicina	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	2	33 - 35	25 h	1:24	0.25	1 semana
Nistatina	<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	2601	19	29 - 31	48 h	1:35	1.0	4 semanas
Paromomicina	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	1	32 - 35	24 h	1:24	2.0	1 semana
Penicilina G	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	1	32 - 35	24 h	1:20	1.0	1 semana
Polimixina B	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617	1	32 - 35	24 h	1:20	0.1	2 semanas
Rifampicina	<i>Bacillus subtilis</i>	6633	32	32 - 35	5 días	-	Determinar	6 semanas
Vancomicina	<i>Bacillus subtilis</i>	6633	32	32 - 35	5 días	-	Determinar	6 semanas

<sup>a</sup> American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas VA 20110-2209 (<http://www.atcc.org>)

\*Anteriormente: *Micrococcus luteus*



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Tabla 0100.5. Microorganismo de prueba para valoración turbidimétrica.

Antibiótico	Condiciones de incubación					Composición sugerida del inóculo	
	Organismo de prueba	Número de ATCC <sup>a</sup>	Medio <sup>b</sup>	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Medio <sup>b</sup>	Cantidad (mL/100 mL)
Amikacina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	1	32 a 35	24	3	0.1
Cloranfenicol	<i>Escherichia coli</i>	10536	1	32 a 35	24	3	0.7
Clortetraciclina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	1	32 a 35	24	3	0.1
Demeclociclina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	1	32 a 35	24	3	0.1
Doxiciclina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	1	32 a 35	24	3	0.1
Estreptomicina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031	1	36 a 37.5	16 - 24	3	0.1
Gramicidina	<i>Enterococcus hirae</i>	10541	3	36 a 37.5	16 - 18	3	1
Kanamicina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	1	32 a 35	24	3	0.2
Metaciclina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	1	32 a 35	24	3	0.1
Neomicina	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031	1	36 a 37.5	16 - 24	39	2



"2026, Año de Margarita Maza Parada"

Oxitetraciclina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	1	32 a 35	24	3	0.1
Tetraciclina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	1	32 a 35	24	3	0.1
Trobamicina	<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	1	32 a 35	24	3	0.15

<sup>a</sup>American Type

<sup>b</sup> Véase *Medios y soluciones*.

Culture Collection

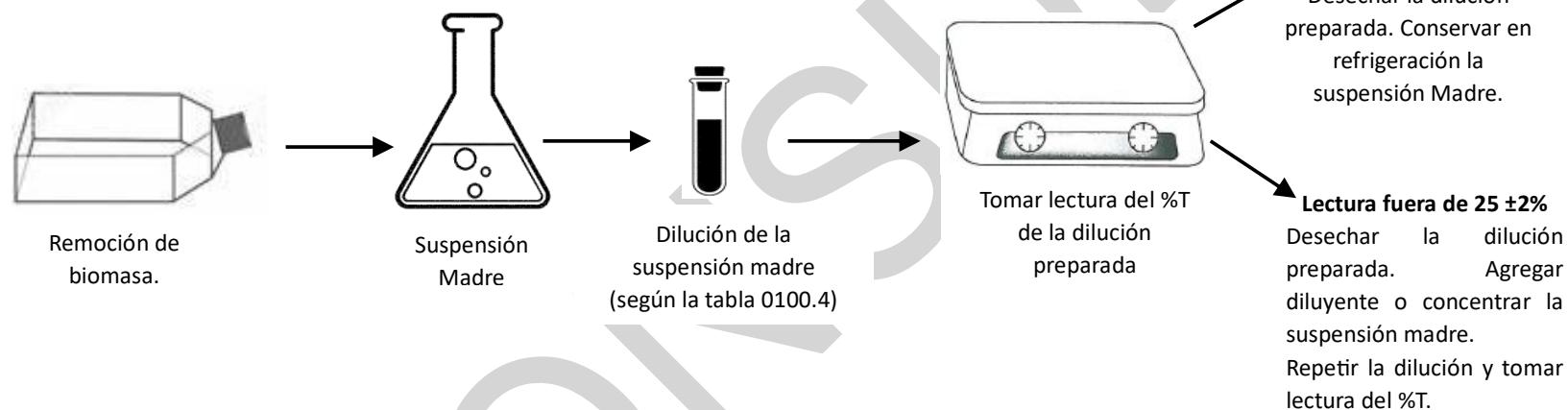
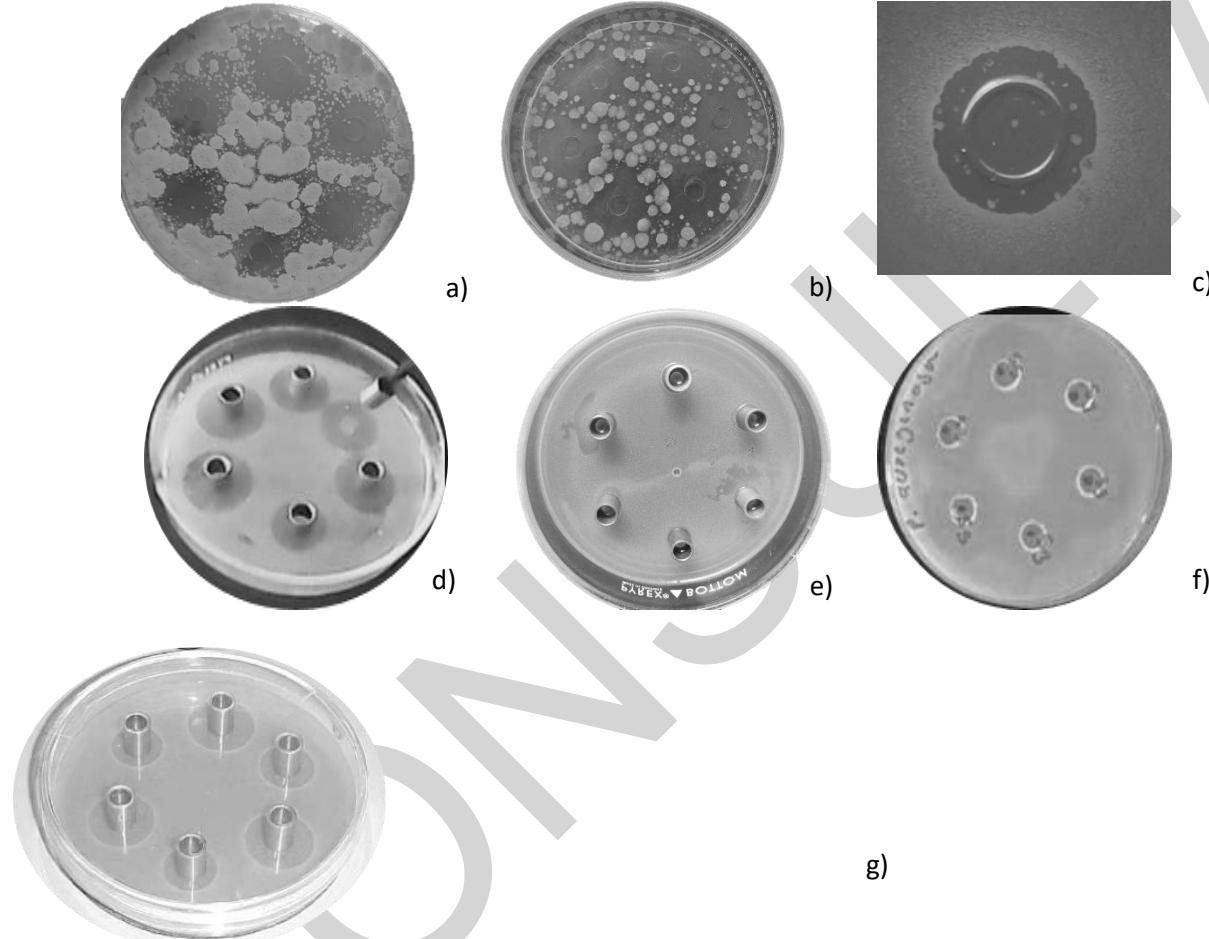


Figura 0100.1. Ajuste de la suspensión madre.



*“2026, Año de Margarita Maza Parada”*



*Figura 0100.2. Ejemplo. a) y b) placas con inoculo sin crecimiento homogéneo ni zonas de inhibición definidas; c) y d) Crecimiento de contaminantes dentro de la zona de inhibición; e) contaminación y presencia de burbujas sobre la capa siembra; f) zonas de inhibición que se unen entre ellas y g) placa que cumple con los requisitos necesarios para considerar lecturas válidas.*



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Tabla 0100.6. Preparación de la solución madre y diluciones de prueba de la Sustancia de referencia (método cilindro-placa).

Antibiótico	Disolvente inicial, (y concentración inicial donde se especifique) diluyente posterior si es diferente	Solución madre		Dilución de prueba	
		Conc. final de la solución madre (mL)	Duración en refrigeración	Diluyente final	Conc. media (unidades o µg/mL) (c)
Ampicilina <sup>(1)</sup>	Agua	0.1 mg	7 días	B. 3	0.1 µg
Amfotericina B <sup>(1) (2)</sup>	Dimetil sulfóxido	1 mg	Mismo día	B. 10	1.0 µg
Bacitracina de zinc <sup>(3)</sup>	Ácido clorhídrico 0.01 N	100 UI	Mismo día	B. 1	1.0 UI
Bleomicina	B. 16	2 UI	14 días	B. 16	0.04 UI
Carbenicilina	B. 1	1 mg	14 días	B. 1	20 µg
Cefalotina	B. 1	1 mg	5 días	B. 1	1.0 µg
Cloxacilina	B. 1	1 mg	7 días	B. 1	5.0 µg
Colistina	Agua (10 mg/mL); [B. 6]	1 mg	14 días	B. 6	1.0 µg
Eritromicina	Metanol (10 mg/mL); [B. 3]	1 mg	14 días	B. 3	1.0 µg
Gentamicina	B. 3	1 mg	30 días	B. 3	0.1 µg
Natamicina	Dimetil sulfóxido	1 mg	Mismo día	B. 10	5.0 µg
Neomicina <sup>(4)</sup>	B. 3	1 mg	14 días	B. 3	1.0 µg
Netilmicina	B. 3	1 mg	7 días	B. 3	0.1 µg
Nistatina <sup>(1) (5)</sup>	Dimetilformamida	1 000 UI	Mismo día	B. 6	20 UI
Paromomicina	B. 3	1 mg	21 días	B. 3	1.0 µg
Penicilina G	B. 1	1 000 UI	4 días	B. 1	1.0 UI
Poliximina B <sup>(6)</sup>	Agua; [B.6]	10 000 UI	14 días	B. 6	10 UI
Rifampicina	Metanol	1 mg	1 día	B. 1	5.0 µg



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Vancomicina

Agua

1 mg

7 días

B. 4

10 µg

**Notas:** “B” denota “solución amortiguadora” y el número que sigue se refiere a las soluciones amortiguadoras de fosfato de potasio definidas en este capítulo.

- (1) Para amfotericina B, colismetato sódico y nistatina, preparar las diluciones de la sustancia de referencia y de la muestra simultáneamente.
- (2) Para amfotericina B, diluir nuevamente la solución madre con dimetil sulfóxido para obtener concentraciones de 12.8, 16, 20, 25 y 31.2 µg/mL antes de realizar las diluciones de prueba. La *Dilución de prueba* de la muestra debe contener la misma cantidad de dimetil sulfóxido que las diluciones de la sustancia de referencia.
- (3) Para bacitracina zinc, cada una de las diluciones de prueba deben contener la misma cantidad de ácido clorhídrico que la *Dilución de prueba* de la muestra.
- (4) Para la valoración turbidimétrica de neomicina, diluir la solución madre de 100 µg/mL en forma cuantitativa con *Solución amortiguadora n.º 3* para obtener una solución con una concentración equivalente a 25.0 µg /mL de neomicina. A matraces volumétricos de 50 mL separados, agregar 1.39, 1.67, 2.00, 2.40 y 2.88 mL de esta solución, agregar 5.0 mL de ácido clorhídrico 0.01 N a cada matraz, diluir a volumen con *Solución amortiguadora n.º 3* y mezclar para obtener soluciones con concentraciones de 0.69, 0.83, 1.0, 1.2 y 1.44 µg/ mL de neomicina. Utilizar estas soluciones para preparar la línea de respuesta de la sustancia de referencia.
- (5) Para la nistatina, diluir nuevamente la solución madre con dimetilformamida para obtener concentraciones de 256, 320, 400, 500 y 624 Unidades/mL antes de realizar las diluciones de prueba. Preparar las soluciones de línea de respuesta de la sustancia de referencia simultáneamente con las diluciones de la muestra que se desea analizar. La *Dilución de prueba* de la muestra debe contener la misma cantidad de dimetilformamida que las diluciones de prueba de la sustancia de referencia. Utilizar recipientes de vidrio con protección actínica.
- (6) Para la Polimixina B, preparar la solución madre añadiendo 2 mL de agua por cada 5 mg de la sustancia de referencia.

Tabla 0100.7. Capa base, capa siembra y condiciones de incubación de la prueba.

Antibiótico	Capa base		Capa siembra		Condiciones de incubación (°C)
	Medio	Volumen (mL)	Medio	Volumen (mL)	
Ampicilina	1	21	1	4	32 - 35
Amfotericina B	NR	NR	19	8	29 - 31
Bacitracina zinc	2	21	1	4	32 - 35
Bleomicina	35	10	35	6	32 - 35
Carbenicilina	9	21	10	4	36 – 37.5
Cefalotina	2	21	1	4	32 - 35

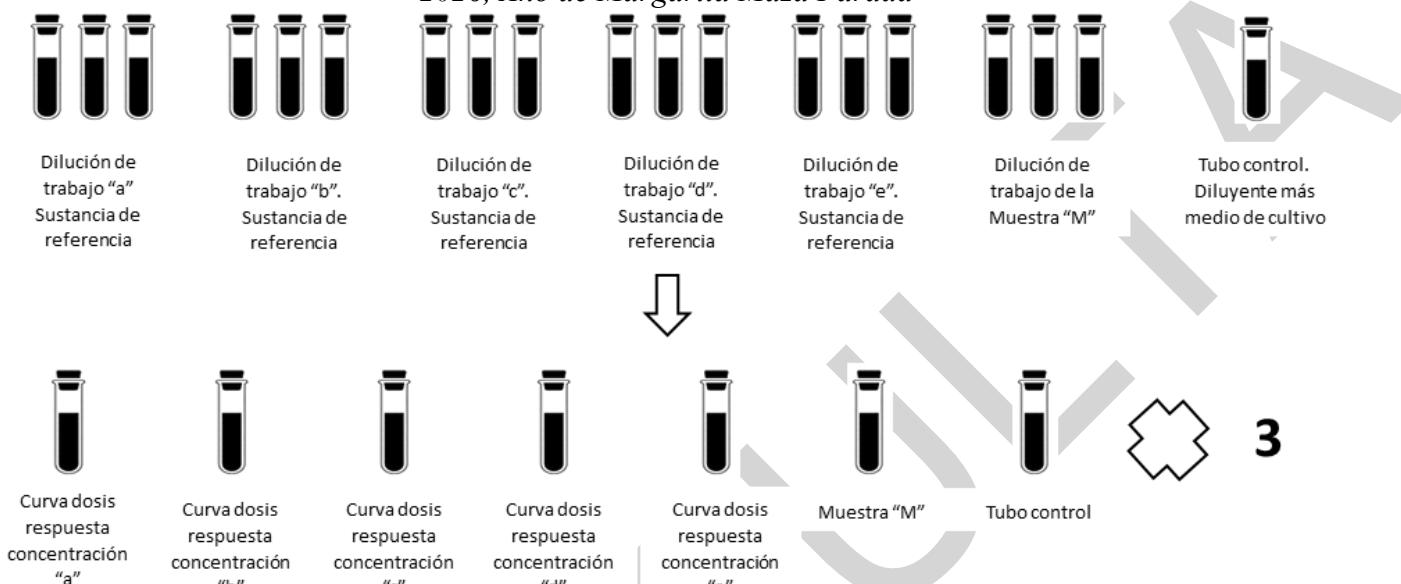


*"2026, Año de Margarita Maza Parada"*

Cloxacilina	2	21	1	4	32 - 35
Colistina	9	21	10	4	36 – 37.5
Eritromicina	11	21	11	4	32 - 35
Gentamicina	11	21	11	4	36 – 37.5
Neomicina	11	21	11	4	36 – 37.5
Netilmicina	11	20	11	5	36 – 37.5
Nistatina	NR	NR	19	8	29 - 31
Paromomicina	11	21	11	4	36 – 37.5
Penicilina G	2	21	1	4	32 - 35
Polimixina B	9	21	10	4	36 – 37.5
Rifampicina	2	21	2	4	32 - 35
Vancomicina	8	10	8	4	36 – 37.5

NR: no requerido

<sup>(1)</sup> Se puede usar la valoración turbidimétrica como un procedimiento alternativo.



Curva dosis-respuesta: "a", "b", "c", "d" y "e"; muestra y tubo control más 9 mL de medio inoculado. Colocar los tubos de manera aleatoria dentro de la gradilla e incubar.

*Figura 0100.3 Preparación de tubos para análisis por método turbidimétrico.*



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Tabla 0100.8. Preparación de la solución madre y diluciones de prueba de la Sustancia de referencia (método turbidimétrico).

Antibiótico	Solución madre		Dilución de prueba		
	Disolvente inicial, (y concentración inicial donde se especifique) diluyente posterior si es diferente	Conc. final de la solución madre	Duración en refrigeración	Diluyente final	Conc. media (unidades o µg/mL) (c) <sup>a</sup>
Amikacina	Agua	1 mg	14 días	Agua	10 µg
Cloranfenicol	Etanol (10 mg/mL); [Agua]	1 mg	30 días	Agua	2.5 µg
Clortetraciclina	Ácido clorhídrico 0.01 N	1 mg	4 días	Agua	0.06 µg
Demeclociclina	Ácido clorhídrico 0.1 N	1 mg	4 días	Agua	0.1 µg
Doxiciclina	Ácido clorhídrico 0.1 N	1 mg	5 días	Agua	0.1 µg
Estreptomicina	Agua	1 mg	30 días	Agua	30 µg
Gramicidina	Alcohol 95 %	1 mg	30 días	Alcohol 95 %	0.04 µg
Kanamicina	Agua	1 mg	30 días	Agua	10 µg
Neomicina <sup>b,d</sup>	B. 3 <sup>c</sup>	100 µg	14 días	B. 3	1.0 µg
Oxitetraciclina	Ácido clorhídrico 0.1 N	1 mg	4 días	Agua	0.24 µg
Tetraciclina	Ácido clorhídrico 0.1 N	1 mg	1 día	Agua	0.24 µg
Trobamicina	Agua	1 mg	14 días	Agua	2.5 µg

<sup>a</sup> Microgramos (µg) en esta columna se refiere a microgramos de actividad.

<sup>b</sup> Se puede usar la valoración en cilindro – placa como un procedimiento alternativo.

<sup>c</sup> La letra B se refiere a la solución amortiguadora. Véase *Medios y Soluciones*, Soluciones amortiguadoras para una descripción de cada solución amortiguadora listada en esta tabla.

<sup>d</sup> Diluir la solución madre de 100 µg/mL con Solución amortiguadora B.3 para obtener una solución con una concentración equivalente a 25 µg/mL de Neomicina. Agregar 1.39; 1.67; 2.00; 2.40 y 2.88 mL de esta solución a matraces volumétricos de 50 mL. Agregar 5.0 mL de ácido clorhídrico 0.01 N a cada matraz, diluir con Solución amortiguadora B.3 a volumen y mezclar para obtener soluciones con concentraciones de 0.69; 0.83; 1.0; 1.2 y 1.44 µg/mL de neomicina. Usar estas soluciones para preparar la curva tipo de la sustancia de referencia.



*“2026, Año de Margarita Maza Parada”*

*Tabla 0100.9. Incubación de la prueba.*

<b>Antibiótico</b>	<b>Tiempo de Incubación (h)</b>
Amikacina	3 a 4
Cloranfenicol	3 a 4
Clortetraciclina	4 a 5
Demeclociclina	3 a 4
Doxiciclina	4 a 5
Estreptomicina	4 a 5
Gramicidina	4 a 5
Kanamicina	4 a 5
Neomicina	4 a 5
Oxitetraciclina	4 a 5
Tetraciclina	4 a 5
Trobamicina	4 a 5

*Tabla 0100.10. Valores de transmitancia para detener el crecimiento.*

<b>Antibiótico</b>	<b>% Transmitancia en Tubos C</b>
Amikacina	50
Cloranfenicol	50
Clortetraciclina	45
Demeclociclina	50
Doxiciclina	50
Estreptomicina	50
Gramicidina	45
Kanamicina	50
Neomicina	50
Tetraciclina	45
Trobamicina	50



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Tabla 0100.11. Ejemplificación de valoración Cilindro – Placa. Curva tipo de la Sustancia de Referencia y resultados de una muestra.

Soluciones de trabajo (sustancia de referencia)	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Placa 1 (mm)			Placa 2 (mm)			Placa 3 (mm)			$\bar{x}$	$\sigma$	RDS (%)
		Zona 1	Zona 2	Zona 3	Zona 4	Zona 5	Zona 6	Zona 7	Zona 8	Zona 9	(mm)		
(ca)	1	14.2	14.8	14.4	14.8	14.2	14.4	14.2	14.6	14.4	14.44	0.24	1.7
a	0.64	12.6	13.0	12.8	13.0	12.8	12.6	12.0	13.8	12.8	12.82	0.47	3.7
(cb)	1	14.4	14.6	14.8	14.8	14.0	14.8	13.4	14.8	15.2	14.53	0.54	3.7
b	0.8	13.8	13.8	14.2	13.2	13.4	13.8	13.4	13.6	14.0	13.69	0.32	2.3
(cd)	1	15.6	15.2	15.0	14.2	14.8	14.2	15.2	15.0	14.0	14.80	0.55	3.7
d	1.25	15.2	15.8	15.6	15.4	15.4	14.8	15.2	14.8	15.4	15.29	0.33	2.2
(ce)	1	14.6	14.6	15.0	14.0	14.8	14.0	14.4	14.2	14.4	14.44	0.34	2.4
e	1.56	16.2	16.4	15.6	16.0	15.4	15.6	16.6	16.0	15.0	15.87	0.51	3.2
		$C_{36}$									14.56	0.168	1.2

Muestra													
Soluciones de trabajo de la sustancia de referencia y muestra	Placa 1 (mm)			Placa 2 (mm)			Placa 3 (mm)			$\bar{x}$	$\sigma$	DSR (%)	
	Zona 1	Zona 2	Zona 3	Zona 4	Zona 5	Zona 6	Zona 7	Zona 8	Zona 9	(mm)			
(cm)	14.4	14.6	14.9	14.9	14.3	14.7	14.8	14.2	14	14.53	0.31	2.23	
M	14.8	14.4	14.3	14.2	14.8	14.1	14.8	14.5	14.1	14.44	0.28	2.05	

c<sub>x</sub>: Lecturas de la solución “c” intercaladas en las placas con las soluciones de la curva tipo (“a”, “b”, “d” y “e”).



*“2026, Año de Margarita Maza Parada”*

Tabla 0100.12. Ejemplificación de valoración turbidimétrica. Curva tipo de la Sustancia de Referencia y resultados de una muestra.

Solución de referencia	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Transmitancia			Prom (% T)	$\sigma$	DSR (%)
a	0.64	30.989	31.679	31.789	31.486	0.434	1.38
b	0.8	40.543	43.654	45.917	43.371	2.698	6.22
c	1.0	51.897	53.897	51.935	52.576	1.144	2.18
d	1.25	62.875	63.264	61.001	62.380	1.210	1.94
e	1.56	71.890	70.167	69.879	70.645	1.087	1.54
m	Desconocida	50.568	51.487	49.768	50.608	0.860	1.70

Tabla 0100.13 Resultados de la Desviación estándar de las soluciones de trabajo preparadas a partir de la sustancia de referencia. Método difusión en agar.

Soluciones	Conc ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\bar{x}$ (mm)	$\sigma$	DSR (%)
(c <sub>a</sub> )	1	14.44	0.24	1.7
a	0.64	12.82	0.47	3.7
(c <sub>b</sub> )	1	14.53	0.54	3.7
b	0.8	13.69	0.32	2.3
(c <sub>d</sub> )	1	14.8	0.55	3.7
d	1.25	15.29	0.33	2.2
(c <sub>e</sub> )	1	14.44	0.34	2.4
e	1.56	15.87	0.51	3.2



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Tabla 0100.14. Valores para obtener la línea de la recta por el método de difusión en agar.

	x ( $\mu\text{g/mL}$ )	y (mm)
a =	log (0.64)	12.94
b =	log (0.80)	13.71
c =	log (1.00)	14.56
d =	log (1.25)	15.04
e =	log (1.56)	15.98

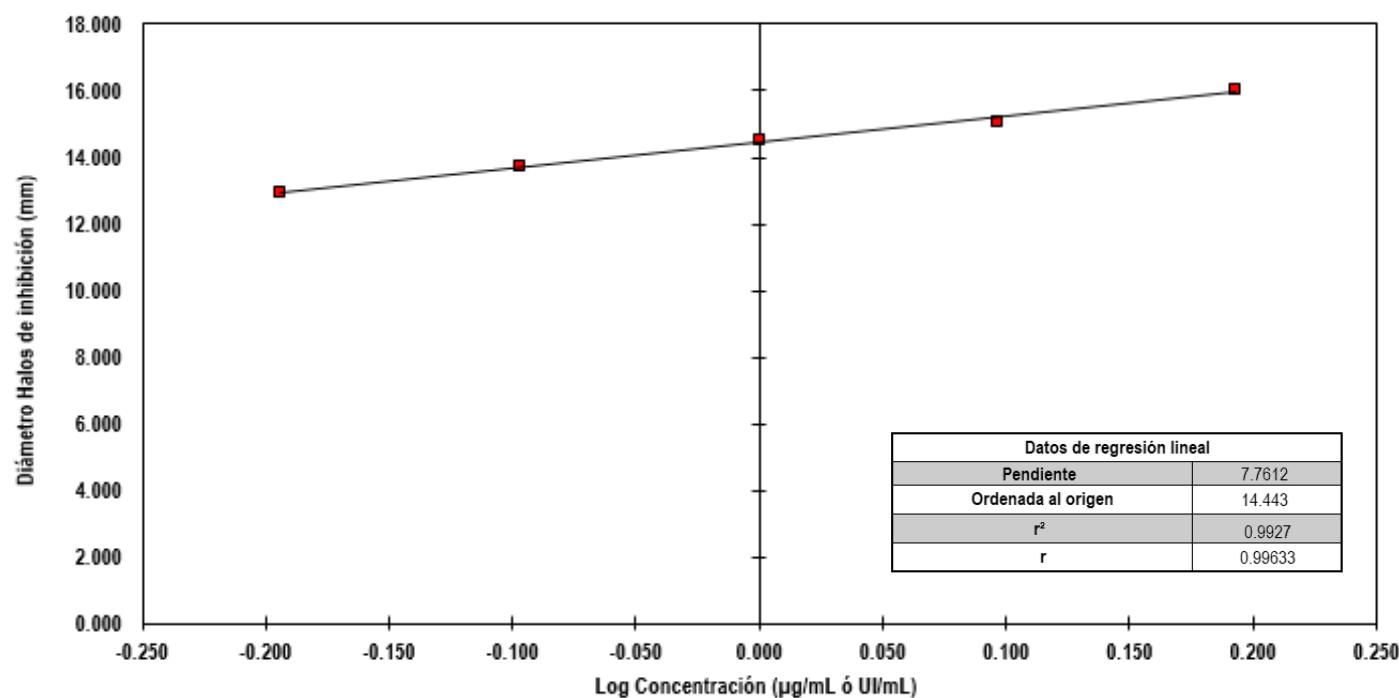
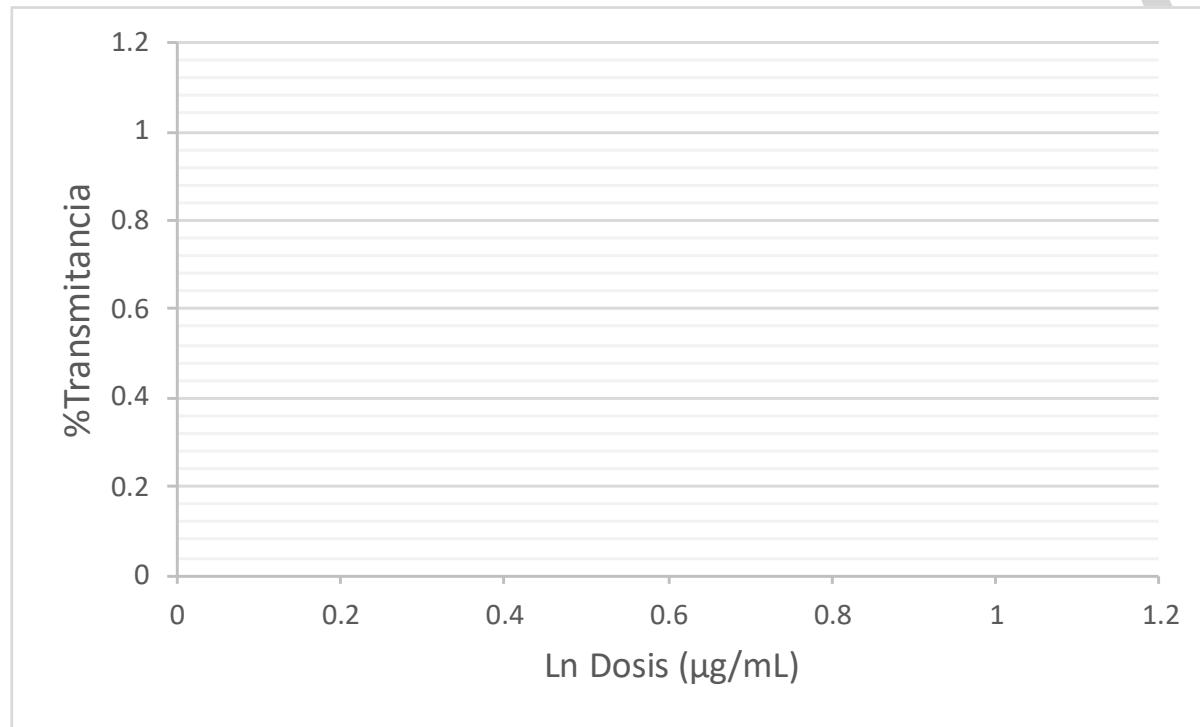


Figura 0100.4. Gráfica de curva tipo, valoración cilindro-placa.



*“2026, Año de Margarita Maza Parada”*



*Figura 0100.5. Gráfica de curva tipo, valoración turbidimétrica.*

\*Para una mejor comprensión de su solicitud adjunte bibliografía u otros documentos que sustenten sus comentarios.